

**Torsten Willert**

*„Analyse und Charakterisierung von ausgewählten signifikanten  
Sense- und Antisense-Transkripten bei chronischer Pankreatitis und  
Bauchspeicheldrüsenkrebs“*

eingereicht als:

**DIPLOMARBEIT**

an der:

**HOCHSCHULE MITTWEIDA**

---

**UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES**

Fakultät für Mathematik, Naturwissenschaften und Informatik

Durchgeführt bei der GenXPro GmbH

Frankfurt am Main, 2009 / 2010



## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Dr. Peter Winter dafür, dass er mir die Durchführung meiner Diplomarbeit in der GenXPro GmbH in Frankfurt am Main ermöglicht hat. Ein besonderer Dank gilt dabei allen Mitarbeitern für das tolle Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bei kleinen und großen Problemen. Dankbar bin ich vor allem Dr. Ralf Horres der mir mit Rat und Tat immer zur Seite stand. Das Korrekturlesen des Manuskriptes sowie die langen, lehrreichen und spannenden Diskussionen über meine Arbeit haben mir sehr weitergeholfen und werden mir fehlen.

Auch bei Frau Prof. Dr. Radehaus möchte ich mich an dieser Stelle sowohl für die Übernahme der internen Betreuung als auch für die viele Geduld bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir nicht nur bei der Finanzierung meines Studiums geholfen haben, sondern auch ständig ein sehr großes Interesse an meiner Arbeit zeigten und mich so gut es ging aus der Ferne unterstützten. Ebenso danke ich meinen Freunden, zu denen inzwischen fast alle meiner Kollegen zählen. Sie haben mich v.a. bei meinen privaten Problemen während meiner Diplomzeit immer moralisch unterstützt, wodurch ich mich die meiste Zeit ohne zusätzliche Sorgen ganz auf meine Arbeit konzentrieren konnte.

Ich widme diese Arbeit meiner Freundin, die nicht nur mein Privatleben bereichert hat, sondern auch immer im richtigen Moment zur Stelle war, um mir neuen Mut und Zuversicht zu geben.

# Bibliographische Beschreibung

Willert, Torsten

Hochschule Mittweida

Mathematik, Naturwissenschaften und Informatik

Umwelttechnik / Biotechnologie

Thema

Analyse und Charakterisierung von ausgewählten signifikanten Sense- und Antisense-Transkripten bei chronischer Pankreatitis und Bauchspeicheldrüsenkrebs

Seitenanzahl	110	Anzahl der Abbildungen	29
Anzahl der Tabellen	5	Anzahl der Literaturzitate	36

Kurzreferat

Ziel der Diplomarbeit ist die Analyse und Identifizierung signifikant differentiell exprimierter Sense- und Antisense-Transkripte zur Erforschung und Entwicklung geeigneter diagnostischer Tumormarker für Bauchspeicheldrüsenkrebs.

Mit Hilfe des von der GenXPro GmbH entwickelten und patentierten SuperSAGE-Verfahrens können RNA-Transkripte, die sowohl aus gesundem als auch aus an Krebs erkranktem Pankreasgewebe isoliert wurden, quantifiziert und entsprechende Genexpressionprofile erstellt werden. Auf Grundlage dieser Daten sollen genetische Tumormarker entwickelt werden, wobei vor allem stark differentiell exprimierte RNA-Transkripte im Vordergrund stehen - insbesondere Antisense-RNA. Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR oder qPCR) ist dabei ein geeignetes Mittel zum Test fluoreszenzmarkierter Sonden auf Eignung als Tumormarker sowie zur Validierung der SuperSAGE-Daten. Dabei wurden bekannte Verfahren wie TaqMan™ und SYBR® Green Assays angewandt.

Schlagworte

Pankreaskarzinom - chronische Pankreatitis - Transkription - Genexpression - SuperSAGE - qRT-PCR - Sense - Antisense - Quantifizierung - TaqMan™ - SYBR® Green - cDNA-Synthese - reverse Transkription - nested PCR - Gelelektrophorese - Klonierung - Ligation - Transformation - Blau-Weiß-Screening - Colony-PCR - NCBI - BLAST

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>A. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>B. THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>4</b>
B.1 Bauchspeicheldrüse .....	4
B.2 Pankreaskarzinom – Bauchspeicheldrüsenkrebs.....	5
B.3 Pankreatitis - Bauchspeicheldrüsenentzündung .....	8
B.4 DNA - Träger der Erbinformation .....	10
B.5 RNA - Umsetzung genetischer Informationen .....	12
B.5.1 Transkription und Translation .....	15
B.5.2 Sense- und Antisense-RNA.....	19
B.6 SuperSAGE-Technologie .....	22
B.6.1 Vorteile von SuperSAGE .....	26
B.7 RNA-Qualität und Integrität .....	27
<b>C. MATERIAL .....</b>	<b>30</b>
C.1 Chemikalien .....	30
C.2 Geräte .....	32
C.3 Kits .....	33
C.4 Lösungen und Puffer.....	33
C.5 Probenmaterial.....	35
C.6 Sonstige Materialien.....	36

<b>D.   METHODEN</b>	<b>37</b>
D.1   BLAST-Analysen von SUPERTAGS- und genomischen Sequenzen in öffentlichen Datenbanken	37
D.2   RNA-Behandlung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle	40
D.2.1   Behandlung der RNA mit Baseline-ZERO™ DNase	40
D.2.2   RNA Clean-Up XS	40
D.2.3   Quantifizierung und Qualitätskontrolle von RNA und DNA mittels Absorptionsmessung	41
D.2.4   Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA mit dem Small RNA Kit von Agilent Technologies	42
D.3   Herstellung und Quantifizierung von cDNA	44
D.3.1   Reverse Transkription	44
D.3.2   Das SuperScript III™ Doppelstrang-cDNA Synthese-Kit von Invitrogen	46
D.3.3   cDNA-Synthese mit dem Sprint™ RT Kit von Clontech	48
D.4   Polymerase-Kettenreaktion	48
D.4.1   SYBR® Green qRT-PCR	50
D.4.2   TaqMan™ qRT-PCR	52
D.4.3   Interpretation der TaqMan-Ergebnisse	55
D.4.4   Nested PCR	58
D.4.5   Strang-spezifische qRT-PCR	59
D.5   Klonieren von PCR-Produkten	60
D.5.1   Prinzip des Blau-Weiß-Screenings	60
D.5.2   Ligation von DNA in einen Vektor	61
D.5.3   Transformation von kompetenten Zellen	62
D.5.4   Colony-PCR	62
D.6   Agarose-Gelelektrophorese	63
D.7   Verwendete Computerprogramme	64
D.7.1   BioEdit	64
D.7.2   Primer 3	64
D.7.3   BLAST-Programme	64
D.7.4   StepOne Software	65
D.7.5   Digi-Print® Control Software	65

---

<b>E.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>66</b>
E.1	Isolation, Identifikation und Quantifizierung von Antisense-RNA.....	66
E.1.1	Auswahl von Kandidaten für qPCR.....	66
E.1.2	Antisense-cDNA-Synthese mit "Tagged" Primern .....	69
E.1.3	Ergebnisse der Antisense qPCR .....	71
E.1.4	Klonierung und Nested-PCR-Ansatz .....	72
E.2	Isolation, Identifikation und Quantifizierung von Sense-RNA .....	74
E.2.1	Auswahl von Kandidaten für TaqMan PCR .....	75
E.2.2	Ergebnisse der qPCR .....	77
<b>F.</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK .....</b>	<b>79</b>
<b>G.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>82</b>
<b>H.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>83</b>
<b>I.</b>	<b>QUELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>

---

## Abkürzungs- und Einheitsverzeichnis

<b><i>Kurzzeichen</i></b>	<b><i>Bedeutung</i></b>
ABS	Applied Biosystems
AMV	Avian Myeloblastosis Viral
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin / Rinderalbumin
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
COL1A2	Collagen Typ 1 Alpha 2
CP	chronische Pankreatitis
Ct	Cycle Treshhold
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat / Diethylpyrocarbonat
DNA/DNS	Deoxyribonucleic Acid / Desoxyribnukleinsäure
cDNA	Copy-DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer, Locus 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Tu/EF1A	Elongation Factor Tu / Elongation Factor 1 Alpha



---

<b><i>Kurzzeichen</i></b>	<b><i>Bedeutung</i></b>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	Expressed Sequence Tags
FAM	Fluorophor
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FOX	Forkhead Box
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
GenXPro	Name der Firma nach Gene expression Profiling
IPMT	Intraduktales Papilläres Muzinöses Tumor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K-ras	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
lacZ	codiert für das Enzym $\beta$ -Galactosidase
	Lysogeny Broth
LB-Medium	Hefeextrakt (5 g/l), Trypton (10 g/l), Natriumchlorid (0,5 bis 10 g/l)
MCS	Multiple Cloning Site
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia

<b><i>Kurzzeichen</i></b>	<b><i>Bedeutung</i></b>
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerase Kettenreaktion
PRSS1	protease, serine, 1 (trypsin 1)
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
qPCR (neuer)	
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends / schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden
RNA/RNS	Ribonucleic Acid / Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	Micro-RNA
rRNA	Ribosomal-RNA
tRNA	Transfer-RNA
siRNA	small interfering RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nucleic RNA
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression / serielle Analyse der Genexpression
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis / Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
snRNP	small nucleic Ribonucleicprotein Particle
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms Einzelnukleotidaustausch /Sequenzvariabilitäten
SOC-Medium	Derivat aus SOB (Super Optimal Broth) + Glucose

<b><i>Kurzzeichen</i></b>	<b><i>Bedeutung</i></b>
SPINK1	Seriner Peptidase Inhibitor, Kazal Typ 1 / pancreatic secretory trypsin inhibitor
T/A-Ligation	Thymin/Adenosin-spezifische Ligation
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
VE	Vollentsalzt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
bp	base pairs / Basenpaare
°C, K	Grad Celsius, Kelvin (Temperatureinheiten)
g, mg, $\mu$ g, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm (Masseeinheiten)
l, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter (Volumeneinheiten)
Mas%	Masse-Prozent
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
s, min, h	Sekunde, Minute, Stunde (Zeiteinheiten)
x g	Vielfaches der Fallbeschleunigung

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> <i>Die Bauchspeicheldrüse und ihre benachbarten Organe .....</i>	<b>4</b>
<b>Abbildung 2:</b> <i>Zellteilung in gesundem Gewebe im Vergleich zu Zellteilung in Krebsgewebe.....</i>	<b>7</b>
<b>Abbildung 3:</b> <i>Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom.....</i>	<b>8</b>
<b>Abbildung 4:</b> <i>Strukturformel eines DNA-Ausschnittes .....</i>	<b>11</b>
<b>Abbildung 5:</b> <i>Schematische Darstellung von Transkription und Translation in einer eukaryotischen Zelle.....</i>	<b>18</b>
<b>Abbildung 6:</b> <i>Transkription einer Sense-RNA.....</i>	<b>20</b>
<b>Abbildung 7:</b> <i>Translationshemmung durch Antisense-Oligonucleotide.....</i>	<b>21</b>
<b>Abbildung 8:</b> <i>Schematische Darstellung des SuperSAGE Verfahrens .....</i>	<b>25</b>
<b>Abbildung 9:</b> <i>Genauigkeit eines 26 bp gegenüber einem 18 bp Tag.....</i>	<b>26</b>
<b>Abbildung 10:</b> <i>Formaldehyd-Agarosegel von Gesamt-RNA aus verschiedenen Organismen .....</i>	<b>28</b>
<b>Abbildung 11:</b> <i>Beispiel für das Ergebnis eines NCBI-BLAST .....</i>	<b>38</b>
<b>Abbildung 12:</b> <i>Darstellung einer Transkript-Sequenz im FASTA-Format .....</i>	<b>38</b>
<b>Abbildung 13:</b> <i>Schematische Darstellung der Absorptionsmessung in einem Nanophotometer .....</i>	<b>42</b>

<b>Abbildung 14:</b> <i>Prinzip des RNA-Chips</i> .....	43
<b>Abbildung 15:</b> <i>Schematische Darstellung einer reversen Transkription mit Oligo(dT)-Primer</i> .....	45
<b>Abbildung 16:</b> <i>Schematische Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	49
<b>Abbildung 17:</b> <i>Einfluss der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Amplitaq-DNA-Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan<sup>TM</sup> PCR</i> .....	54
<b>Abbildung 18:</b> <i>Standard-Kurve einer Real-Time PCR</i> .....	55
<b>Abbildung 19:</b> <i>Amplifikations-Plot erstellt mit der StepOne Software</i> .....	57
<b>Abbildung 20:</b> <i>Schematische Darstellung einer Nested PCR</i> .....	58
<b>Abbildung 21:</b> <i>Darstellung Ddes Pgem®-T Vektors mit Sequenzreferenzpunkten</i> ..	61
<b>Abbildung 22:</b> <i>Primer und Sonden für ein Antisense-qPCR-Assay am Beispiel von COL1A2, bei dem der „Tagged“ Primer auf dem SuperTag liegt</i> .....	68
<b>Abbildung 23:</b> <i>Amplifikationsplot nach Test von drei AS-Assays mit Antisense cDNA- Mix als Templat.</i> .....	71
<b>Abbildung 24:</b> <i>Amplifikationsplot nach Test vom As-Assay für COL1A2 mit den vier cDNAs der untersuchten Pankreas-Gewebe als Templat</i> .....	71
<b>Abbildung 25:</b> <i>Colony-PCR mit M13-Primern.</i> .....	73

---

<b>Abbildung 26:</b> <i>Nested MangoTaq PCR nach 1. PCR mit M13 Primern und Ligationsansatz als Templat .....</i>	<b>73</b>
<b>Abbildung 27:</b> <i>Primer und Sonden für Sense-qPCR-Assay am Beispiel von EGFR .....</i>	<b>75</b>
<b>Abbildung 28:</b> <i>Sense-qPCR-Assay für Tag Panc-23465 .....</i>	<b>77</b>
<b>Abbildung 29:</b> <i>Sense-qPCR-Assay für Tag Panc-25063.....</i>	<b>77</b>

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Gesamt-RNA-Probenmaterial verschiedener Spender .....	35
<b>Tabelle 2:</b> <i>Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse einiger aRNA-Kandidaten für die qPCR</i> .....	67
<b>Tabelle 3:</b> <i>Ergebnisse und Vergleich der Antisense-cDNA-Ausbeute aus Gesamt-RNA</i> .....	69
<b>Tabelle 4:</b> Ergebnisse und Vergleiche der Antisense-cDNA-Ausbeute aus ampRNA .....	70
<b>Tabelle 5:</b> <i>Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse von sieben konstitutiven Sense-Kandidaten für qPCR</i> .....	75
<b>Tabelle 6:</b> <i>Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse einiger Kandidaten für die qPCR</i> .....	76

## A. EINLEITUNG

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Dennoch ist nicht jeder Krebsverlauf tödlich, falls rechtzeitig eine Therapie begonnen wird oder der Krebs erst in hohem Lebensalter auftritt und dann nur langsam wächst. Die derzeitige Heilungsrate bei allen Krebserkrankungen beträgt durchschnittlich 30 bis 40 %. Die Krebserkrankung äußert sich in verschiedenen Ausprägungen und Krankheitsbildern, daher können keine generellen Aussagen bezüglich Lebenserwartung und Heilungschancen getroffen werden. Auf Grund der Tatsache, dass es etwa 100 verschiedene derzeit bekannte Formen der Krebserkrankung gibt, die sich in Überlebenschance, Behandlungsmöglichkeiten und der Neigung zur Bildung von Metastasen teilweise stark unterscheiden, ergeben sich auch mindestens genauso viele Varianten des Verlaufs der Krankheit.

Krebs ist keinesfalls eine Erkrankung der Neuzeit. Es ist eine, evolutionsgeschichtlich gesehen, sehr alte Erkrankung, die auch Pflanzen und Tiere betreffen kann. Die ältesten Krebsbefunde liefern Saurier-Knochen. Auch unsere Vorfahren, wie beispielsweise der Australopithecus (4,2 bis 2 Millionen Jahre vor Christus), hatten Krebs. Krebserkrankungen haben die Menschheit während der gesamten Evolution begleitet. So werden im Papyrus Ebers aus der Zeit 1550 vor Christus Erkrankungen beschrieben, die dem Krankheitsbild von Krebs entsprechen (Greaves, 2002).

Bei der Erforschung und Entwicklung neuer Behandlungsmethoden steht vor allem die Diagnostik im Vordergrund. Die Früherkennung von Symptomen und Körpersignalen ist entscheidend, um die entstehenden Neoplasmen erfolgreich behandeln bzw. entfernen zu können. Da die Entstehung von Krebs auf genetischen Veränderungen beruht, wird vor allem im molekularbiologischen Bereich an neuen diagnostischen Möglichkeiten geforscht. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Erfassung und Interpretation der genetischen Veränderungen, die dem Krebs voraus gehen. Wäre es möglich diese Signale zu erkennen, könnten Gegenmaßnahmen eingeleitet werden, noch bevor das neoplastische Gewebe ein größeres Volumen erreichen und sich durch Metastasierung im ganzen Körper verteilen kann, was zu körperlichen Beeinträchtigungen und Fehlfunktionen führt. Ebenso würde es radikale



und stark schädigende Behandlungsmethoden, wie Chemo- und Strahlentherapie überflüssig machen bzw. eine Behandlung auf den Bereich weniger Tumorzellen beschränken, anstatt große Gewebevolumen oder Organteile (z.B. Pankreaskopf) entfernen zu müssen (Wagener, 2001).

Zurzeit gibt es leider keine Möglichkeit zur Früherkennung eines Pankreaskarzinoms. Wenn ein Patient die ersten Symptome aufweist, hat der Krebs in 80 % der Fälle bereits Metastasen gebildet. Vor allem in Anbetracht der hohen Sterblichkeitsrate des Pankreaskarzinoms, die bei ca. 95 % der Erkrankten noch im ersten Jahr liegt, ist es um so wichtiger, diagnostische Mittel zu entwickeln, die ein frühzeitiges Erkennen von Tumor-Entwicklungen ermöglichen. Denn da eine wirksame Chemotherapie beim Pankreaskarzinom fehlt, bleibt nur noch ein operativer Eingriff, der in der Regel eine Entfernung des Pankreaskopfes bedeutet. Infolge dessen ist der Patient ab diesem Zeitpunkt von der Einnahme einer Vielzahl von Medikamenten sowie von der künstlichen Zuführung von Verdauungshormonen abhängig (Hahn, 2007).

Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess. Tumore sind klonaler Natur und können sich bereits aus einer einzigen Zelle entwickeln. Infolge von Mutationen bzw. epigenetischer Veränderungen werden zelluläre Prozesse, die von entscheidender Bedeutung für Zellwachstum, Zellteilung und Zelltod sind, beeinflusst. Dabei handelt es sich z.B. um Prozesse der Signalübertragung und zur DNA-Reparatur. Die Entstehung von neoplastischem Gewebe ähnelt dabei in vielerlei Hinsicht einem evolutionären Prozess, bei dem die Zellen des entstehenden Tumorgewebes infolge genetischer Mutationen mit jeder weiteren Zellgeneration einen Wachstumsvorteil erhalten. Jedoch sprechen auch mehrere Argumente dafür, dass die normale Mutationsrate nicht ausreicht, um die sequenziellen Mutationen zu erklären, die eine Zelle während einer malignen Transformation durchmacht. Es ist also davon auszugehen, dass noch weitere Prozesse existieren, die eine genomische Instabilität verursachen (Wagener, 2001).

Es ist nachgewiesen, dass Tumorgewebe heterogen ist und aus einer Vielzahl von Subpopulationen mit unterschiedlichen biologischen und metastatischen Eigenschaften besteht. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Tumorzellen mit

unterschiedlichem metastatischem Potential auch Unterschiede in der Expression von Proteinen aufweisen, was der Vergleich von Tumorgewebe mit gesundem Gewebe zeigte (Nakamura, Fidler & Coombes, 2007). Diese Unterschiede konnten mit Hilfe serieller Analysen der Genexpression (SAGE - Serial Analysis of Gene Expression, siehe B.6 SuperSAGE-Technologie) auf die Anzahl der vorhandenen mRNA-Transkripte zurückgeführt werden. Mit Hilfe dieses analytischen Verfahrens wurde in den letzten zehn Jahren eine Vielzahl von Datenbanken mit genetischen Expressionsprofilen verschiedenster Krebsarten angelegt. Auf Grundlage dieser sogenannten "SAGE-libraries" kann nach geeigneten Transkripten gesucht werden, mit deren Hilfe Tumor-Marker entwickelt werden können. Dies eröffnet ein vollkommen neues Verfahren auf dem Gebiet der Krebsdiagnostik und Gentherapie (Argani et al., 2001).

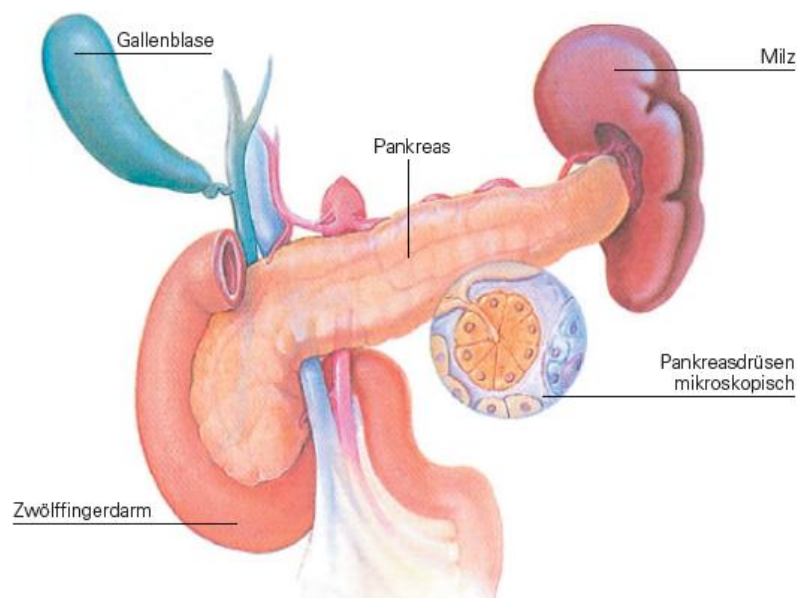
Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von qRT-PCR Assays auf Basis der vorliegenden Genexpressionsdaten der SuperSAGE-Datenbank (siehe B.6 SuperSAGE-Technologie). Durch Analyse und Identifizierung eindeutig differentiell exprimierter RNA-Transkripte verschiedener Tumortypen (stark metastasierend – nicht metastasierend), chronischer Pankreatitis und auch gesundem Pankreasgewebe soll eine verbesserte, vor allem aber eine frühere Diagnose von Bauchspeicheldrüsenkrebs ermöglicht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Sonden sollen zudem die Grundlage für Tumormarker bilden, die in der Lage sein werden, die Entwicklung eines Pankreastumors durch die veränderten Genexpressionen zu detektieren (prognostisch).

## B. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### B.1 Bauchspeicheldrüse

Zum besseren Verständnis der essentiellen Bedeutung der Bauchspeicheldrüse und der (genetischen) Signale, die sie bei Erkrankungen liefert, ist es wichtig, die Funktionen dieses Organs im menschlichen Körper zu betrachten.

Die Bauchspeicheldrüse liegt im mittleren Bereich der oberen Bauchhöhle, zwischen Milz und Leber in einer c-förmigen Schleife des Zwölffingerdarms. Die Vorderseite ist mit Bauchfell überzogen und die Rückseite mit der hinteren Bauchwand verwachsen. Die Drüse ist etwa 15 bis 20 cm lang und 60 bis 80 g schwer. Sie lässt sich in Kopf (liegt in Zwölffingerdarmschlinge), Körper (überquert Hauptschlagader und Wirbelsäule) und Schwanz (erstreckt sich zur Milz) untergliedern.



**Abbildung 1:** Die Bauchspeicheldrüse und ihre benachbarten Organe (Quelle: Deutsche Krebshilfe e.V., 2006)

Der Pankreas ist ein lebenswichtiges Organ. Sein exokriner Teil (Drüsen) produziert täglich etwa 1,5 l Pankreassaft, welcher eine Vielzahl von Verdauungsenzymen enthält, die notwendig sind, um bestimmte Nahrungsbestandteile aufzuschließen und sie für den Körper nutzbar zu machen. Besonders hervorzuheben sind die Enzyme Amylase (Verdauung von Kohlenhydraten) und Lipase (Verdauung von Fetten). Kommt es in diesem Teil der Bauchspeicheldrüse zu Fehlfunktionen oder sogar Funktionsausfällen, kann dies zu Verdauungsstörungen führen. Dadurch werden Bestandteile der Nahrung nicht mehr richtig verdaut und Nährstoffmangel tritt ein. Der Erkrankte verliert an Gewicht und zehrt aus.

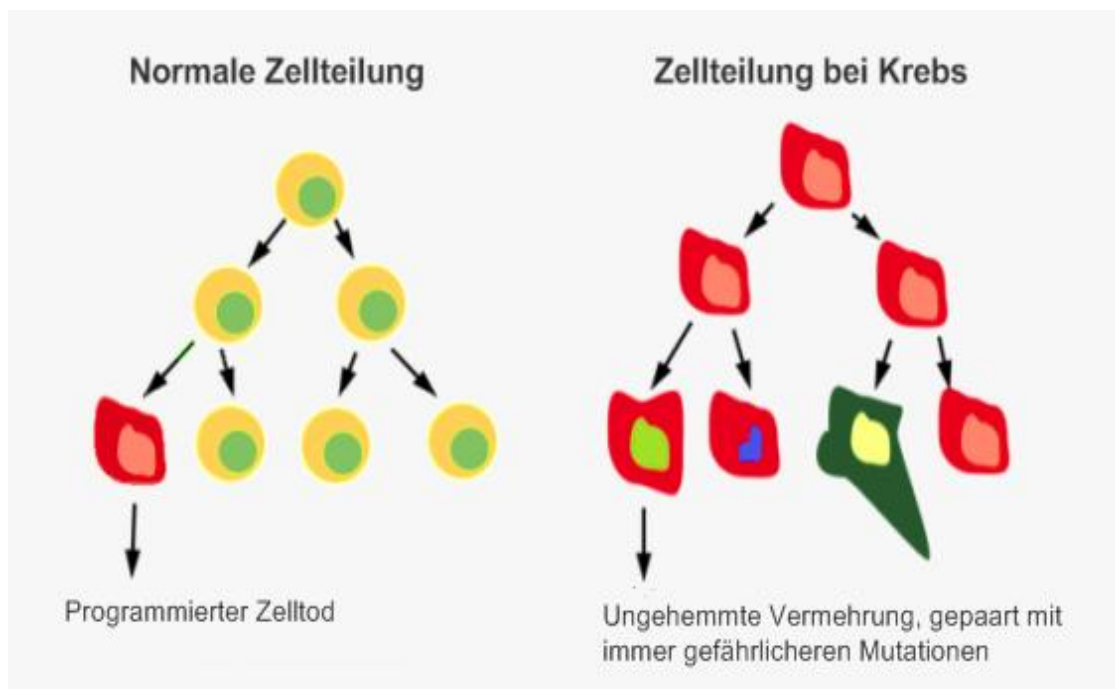
Des Weiteren produziert der Pankreas Proteasen, die Eiweiße spalten und für deren Verdauung wichtig sind. Zwei weitere lebenswichtige Enzyme werden im endokrinen Teil des Pankreas, den sogenannten "Pankreasinseln" oder auch "Langerhans-Inseln", produziert. Hier werden die Hormone Insulin und Glukagon gebildet, die den Blutzuckerspiegel regulieren. Von besonderer Bedeutung ist das Hormon Insulin, welches eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Fette und Proteine spielt. Produziert die Bauchspeicheldrüse zu wenig Insulin, steigt der Blutzuckerspiegel. Diese Unterfunktion und deren Folgen werden als Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) bezeichnet (Deutsche Krebshilfe e.V., 2006).

## **B.2 Pankreaskarzinom – Bauchspeicheldrüsenkrebs**

Der Bauchspeicheldrüsenkrebs gehört zu den sogenannten "Malignomen" (medizinische Bezeichnung für Krebs) - einer bösartigen Gewebeneubildung (Neoplasie). Theoretisch kann jedes Organ des menschlichen Körpers von malignen Neoplasien befallen werden. In Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, kollektiver Zugehörigkeit, geographischer Region, Ernährungsgewohnheiten, Rauchverhalten und einigen weiteren Faktoren kommt es jedoch zu erheblichen Häufigkeitsunterschieden. So steht beispielsweise das Pankreaskarzinom in Deutschland mit etwa 3 % an der 12. Stelle. Unter den Krebstodesfällen belegt es wegen seiner hohen Sterblichkeit (Letalität) in Europa je nach Land sogar Platz fünf bis sieben. In Anbetracht der genetischen Ursachen für Krebs im Allgemeinen, spielt

zur Einschätzung des Risikos einer Erkrankung auch die familiäre Vorbelastung eine entscheidende Rolle (Deutsche Krebshilfe e.V., 2006).

Die Entstehung von Krebs im Allgemeinen ist eine Folge genetischer Defekte im Genom einer Gewebszelle. Dabei reichen die genetischen Veränderungen von Mutationen bis zum Verlust ganzer Chromosomenstücke. Alleine an der sicheren Übertragung des vollständigen genetischen Codes von einer Zelle zur nächsten während der Zellteilung sind etwa 5.000 der insgesamt 25.000 Gene des Menschen beteiligt. Durch die Defekte im genetischen Code dieser Gene kommt es zum Ausfall bestimmter Signale und Mechanismen, die Wachstum, Teilung und Zerstörung einer Zelle regulieren. Diese Gene lassen sich in zwei Gruppen unterteilen – in die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene. Deren Aufgabe bzw. Funktion besteht darin, die korrekte Abfolge der Basenpaare in der DNA nach jeder Reduplikation zu überwachen. Gegebenenfalls leiten sie Reparaturvorgänge in die Wege, wobei der Zellzyklus unterbrochen wird, bis alle Reparaturen durchgeführt wurden. Sollten die Reparaturen nicht zum Erfolg führen, wird automatisch der Zelltod (Apoptose) herbeigeführt. Bisher wird davon ausgegangen, dass das primäre Ereignis im Krankheitsverlauf eine Veränderung in diesen sogenannten „Wächtergenen“ ist, beruhend auf einem Kopierfehler, einer angeborenen oder einer durch äußere Einwirkungen verursachten Mutation. Dieser Effekt führt zum Versagen der durch die Gene regulierten Funktionen, was bei den folgenden Zellgenerationen zu weiteren Defekten führen kann. Mit jedem weiteren betroffenen „Wächtergen“ potenziert sich der Effekt. Kommt es zu einem Defekt der Gene, die den Zelltod regulieren, vermehren sich diese mutierten Zellen ungehemmt, was letztendlich zu Gewebewucherungen und anormalen Zellstrukturen führt (siehe Abbildung 2: *Zellteilung in gesundem Gewebe im Vergleich zu Zellteilung in Krebsgewebe*). Weitere Veränderungen des genetischen Codes können zu neuen Eigenschaften der Zellen führen, die eine effektive Behandlung erschweren (Duesberg, 2007).



**Abbildung 2:** Zellteilung in gesundem Gewebe im Vergleich zu Zellteilung in Krebsgewebe (Quelle: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/1/17/Zellteilung\\_normal\\_im\\_Gegensatz\\_zu\\_Krebs.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/1/17/Zellteilung_normal_im_Gegensatz_zu_Krebs.png))

Bei der Forschung nach neuen Möglichkeiten zur Früherkennung von Bauchspeicheldrüsenkrebs müssen zunächst die einzelnen Stadien der Krebsentwicklung betrachtet werden. Da man die Frühstadien aber nicht erkennen kann, ist dies kaum möglich. Allerdings wurden bei der Untersuchung des Randgewebes von entfernten Tumoren hin zu den angrenzenden gesunden Zellen alle Stadien der Krebsentwicklung gefunden. Es wurde ein sogenanntes "genetisches Tumor-Progressionsmodell" (siehe Abbildung 3: *Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom*) aufgestellt, mit dessen Hilfe Zellveränderungen in der Tumor-Umgebung hinsichtlich Krebs-Vorstufen überprüft werden können. Dieses Modell bezieht sich v.a. auf jene Chromosomenabschnitte, auf denen das Zellwachstum hemmende Tumorsuppressorgene liegen. Diese winzigen Zellhaufen von Krebsvorstufen - sogenannte "PanIn-Stufen" (Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie) – stehen im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen (Hahn, 2007).



Trypsinwirkung, eine unzureichende Produktion von sekretorischen Antiproteasen, eine erhöhte Viskosität des Pankreassafts oder eine gestörte Alkoholentgiftung verursachen. Eine repetitive Folge nekrotisierender und fibrosierender Entzündungsschübe führt zu allmählicher struktureller und funktioneller Destruktion des Parenchyms (Nekrose-Fibrose-Sequenz). Die Folge der chronischen Entzündung ist eine verminderte Organdurchblutung mit einhergehender Übersäuerung des Blutes (Azidose). Das bedeutet letztendlich eine irreversible Schädigung des Pankreas, die sich durch regelmäßige (chronische) Schmerzen äußert (Rosien, Layer, Keller & Kahl, 2008).

Es gibt verschiedene Formen der chronischen Pankreatitis, die sich von der Ursache und Art ihrer Entstehung, vom Verlauf der Krankheit oder von der Lokalisierung des Entzündungsherdes ableiten. Man unterscheidet die idiopathische Form (Ursache und Pathophysiologie ungeklärt), die sich in die juvenile (Kindheits-) und die Altersform unterteilen lässt, die alkoholische Form, deren Ursache ein erhöhter Alkoholkonsum ist sowie die hereditäre Form, die als Sonderform der juvenilen Pankreatitis gesehen werden kann. Insbesondere die Letztere ist die am häufigsten bei Kindern auftretende Form der Pankreatitis. Sie führt über wiederholte Schübe akuter Pankreatitis mit selbstverdauenden Nekrosen zu einer chronischen Pankreatitis und neigt vor allen anderen Formen zur Bildung eines Pankreaskarzinoms (Rosien, Layer, Keller & Kahl, 2008).

Allen Formen der Pankreatitis liegen genetische Veränderungen, wie Mutationen und Veränderungen der Genexpression zu Grunde. Derzeit sind drei Gene bekannt, die maßgeblich die Anfälligkeit eine Pankreatitis zu entwickeln, erhöhen:

- das kationische Trypsinogen PRSS1 (Protease, Serine, 1 (Trypsin 1)),
- das pankreatische sekretorische Trypsin-Inhibitor-Gen SPINK1 (Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 1) und
- das zystische Fibrosegen CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).



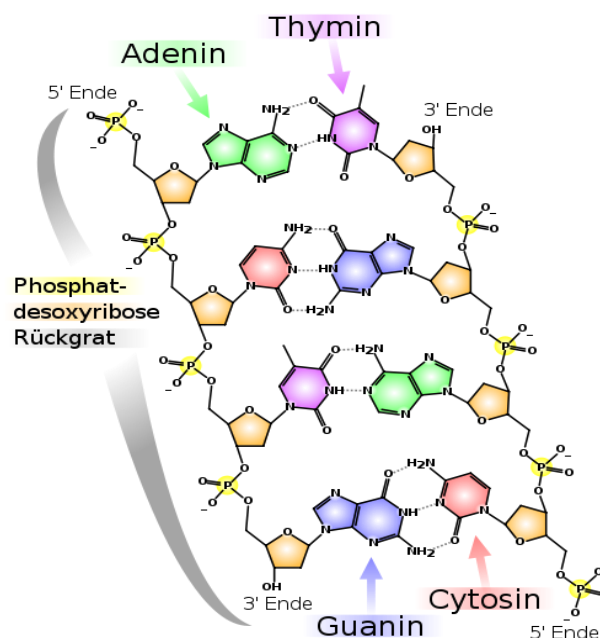
Ein weiterer Gendefekt am Chemokin-Gen MCP-1 führt dazu, dass der Schweregrad der Pankreatitis zunimmt. Ein fortwährender Konsum von Alkohol und das Rauchen erhöhen zudem die Malignität des betroffenen Gewebes. So kann sich eine unbehandelte bzw. durch äußere Einflüsse dauerhaft belastete chronische Pankreatitis zu einem Pankreaskarzinom entwickeln. Infolge dessen heben sich die Symptome bei einem Pankreaskarzinom, das sich im Rahmen einer chronischen Pankreatitis entwickelt, nicht von denen der Grundkrankheit ab (Rosien, Layer, Keller & Kahl, 2008) (Hammer, Hammer & Schöffel, 2006).

## **B.4 DNA - Träger der Erbinformation**

Die Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid) ist ein in allen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen vorkommendes Biomolekül, dass sich aus einzelnen Nucleotiden zusammensetzt. Diese bestehen aus den zwei Komponenten Desoxyribose-5'-phosphat und einer der vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) oder Cytosin (C), welche N-glykosidisch am 1'-C-Atom miteinander verknüpft sind. In der DNA bilden die Nukleotide langkettige Zucker-Phosphodiester-Polymere durch eine Verbindung zwischen dem 5'-C-Atom des einen und dem 3'-C-Atom des anderen Nukleotids. Zwei solcher DNA-Stränge winden sich umeinander und bilden eine Doppelhelix. Die Purin- und Pyrimidin-Basen sind dabei nach innen gewandt und durch Wasserstoffbrückenbindungen hybridisiert. Auf Grund der räumlichen und energetischen Bedingungen bindet immer eine Pyrimidin- an eine Purin-Base sowie Adenin an Thymin (zwei Wasserstoff-Brückenbindungen) und Guanin an Cytosin (drei Wasserstoff-Brückenbindungen) (Watson-Crick-Regel). Des Weiteren beträgt das Verhältnis von Adenin zu Thymin und von Guanin zu Cytosin nach der Chargaff'schen Regel stets etwa eins (Renneberg, 2007). Auf diese Weise sind zwei miteinander hybridisierte DNA-Einzelstränge immer komplementär in ihrer Basensequenz (siehe Abbildung 4: *Strukturformel eines DNA-Ausschnittes*). Die Abfolge der vier Basen eines DNA-Einzelstranges ermöglicht die lineare Speicherung von Informationen und dient gleichzeitig als Matrize, um die enthaltene Information auf einen Gegenstrang mit

komplementärer Basenanordnung zu übertragen (Watson & Crick, 1953; Schmid, 2006).

In den meisten höheren Organismen liegt die DNA in Form von Chromosomen vor, auf die die gesamte Erbinformation des Genoms verteilt ist. Jede Spezies auf der Erde besitzt also in Abhängigkeit von der Menge der Informationen, die das Erbgut umfasst, eine bestimmte Anzahl von Chromosomen. Wobei die Anzahl der Chromosomen kein Indikator für die Höhe der Entwicklungsstufe einer Spezies ist. Die Chromosomen selbst sind Komplexe aus von DNA umwickelten basischen Proteinen, die als Histone bezeichnet werden (Verhältnis 1:1) und das Chromatin bilden, dass sich im Zellkern einer jeden eukaryotischen Zelle befindet. Insgesamt betrachtet besitzt das Erbmaterial eines Zellkerns eine quartäre räumliche Struktur, die die DNA auf ein geringes Volumen reduziert. Würde die DNA einer haploiden menschlichen Zelle mit 23 unterschiedlichen Chromosomen (einfacher Chromosomensatz) in primärer Struktur vorliegen, so hätte sie eine Länge von ca. 1 m pro Zelle (Schmid, 2006).



**Abbildung 4:** Strukturformel eines DNA-Ausschnittes (Quelle: [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Chemische\\_Struktur\\_der\\_DNA.svg&filetimestamp=20090617060254](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Chemische_Struktur_der_DNA.svg&filetimestamp=20090617060254), 17.02.2010)

In prokaryotischen Zellen liegt die DNA mehrheitlich als zirkuläres doppelsträngiges Molekül vor, das eine Länge von meist über 1 mm hat. Des Weiteren kommt die DNA auch in kleinen ringförmigen Doppelsträngen, sogenannten "Plasmiden", vor, die allerdings nicht zur chromosomalen DNA zählen. Beide Formen liegen frei im Cytoplasma einer Zelle, da Prokaryoten keinen Zellkern besitzen. Die Enzyme Topoisomerase und Gyrase bringen die chromosomale DNA in eine kompakte Form (Supercoils), indem sie die DNA aufwickeln (verdrillen) und die Helices zusätzlich noch um sich selbst drehen. In den Bakterien sorgen Topoisomerasen dafür, dass durch ständiges Schneiden und Wiederverknüpfen der DNA der verdrillte Doppelstrang an einer gewünschten Stelle entwunden wird (Voraussetzung für Transkription und Replikation) (Knippers, 1995).

## **B.5 RNA - Umsetzung genetischer Informationen**

Die Ribonukleinsäure, im wissenschaftlichen Sprachgebrauch als RNA (engl. ribonucleic acid) bezeichnet, ist ein Polynukleotid ähnlich der DNA bzw. DNS. Sie unterscheidet sich in zwei strukturellen Eigenschaften von der DNA. Sie enthält Ribose als Zuckerbestandteil anstelle von Desoxyribose und die Base Uracil anstelle von Thymin. Letztere Eigenschaft beruht darauf, dass RNA-Sequenzen nicht auf Fehler in der Basenfolge überprüft werden. Die Base Thymin besitzt im Vergleich zu Uracil eine zusätzliche Methylgruppe, die in der DNA als Erkennungsstelle für "heimische Basen" fungiert. Denn es besteht die Möglichkeit, dass Cytosin durch spontane Desaminierung in Uracil umgewandelt wird. Würde Uracil auch in der DNA verwendet werden, könnte diese Punktmutation nicht erkannt werden. RNA ist zu kurzlebig und wird nach Erfüllung ihrer Funktion abgebaut. Die Hauptfunktion der RNA in einer Zelle besteht in der Umsetzung der genetischen Information der DNA in Proteine. Sämtliche dafür notwendigen Zellbestandteile und Funktionen basieren ebenfalls auf RNA. Es existieren daher verschiedene Formen von RNA (Knippers, 1995; Renneberg, 2007):

Die **mRNA** (engl. *messenger RNA*), auch Boten-RNA genannt, ist der komplementäre Polynukleotid-Strang eines zu einem Gen zugehörigen Abschnitts der DNA, welcher durch das Enzym RNA-Polymerase synthetisiert wird. Die mRNA erhält dabei eine besondere Struktur, die entscheidend für die auf die Transkription folgenden Schritte ist. Das 5'-Ende weist eine sogenannte "5'-Cap-Struktur" (vom englischen *cap* = *Kappe*) auf. Diese Kappe besteht aus einer modifizierten Form des Guanosin. Diese Struktur erfüllt die Funktionen eines Signals, das nach dem Transport der mRNA ins Cytosol die kleine ribosomale Untereinheit an die mRNA andockt. Des Weiteren schützt sie die mRNA vor hydrolysierenden Enzymen. Das 3'-Ende erfährt eine Polyadenylierung. Bei diesem Vorgang wird ein Poly(A)-Schwanz aus 30 bis 200 Adenosin-Nukleotiden angehängt, der die mRNA vor einem enzymatischen Abbau schützt. Zusätzlich erleichtert er den Export der mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma. Jeweils drei Nukleotide der mRNA bilden ein Codon oder Triplet, das repräsentativ für eine Aminosäure steht. (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts & Watson, 1990).

Bei der **snRNA** (engl. *small nucleic RNA*), auch kleine nukleäre RNA genannt, handelt es sich um eine 100 bis 300 Nucleotide lange RNA-Sequenz, die im Zellkern lokalisiert ist. Dort assoziiert sie mit mehreren spezifischen Proteinen zu einem Komplex, der als snRNP (engl. *small nucleic Ribonucleicprotein Particle*) bezeichnet wird. Aus ihm wird das sogenannte "Spleißosom" gebildet. Es besteht aus vier snRNPs mit fünf unterschiedlichen RNAs sowie sieben verschiedenen Proteinen. Als Bestandteil des Spleißosoms besitzt die snRNA eine katalytische Wirkung. Sie ist für die Erkennung und das Spleißen der Introns der im Zellkern enthaltenen prä-mRNA verantwortlich (Weaver, 2005).

Die **snoRNA** (engl. *small nucleolar RNA*) ist an der Synthese und Modifizierung anderer RNA-Arten maßgeblich beteiligt (speziell rRNA). Ebenso wie die snRNA bildet auch diese RNA Komplexe mit Proteinen, die snRNPs genannt werden. Die Aufgabe der snoRNA besteht im Transport katalytischer Proteine an die richtigen Stellen einer zu synthetisierenden RNA. Die bewirkten Modifikationen der snRNPs sind essentiell für die Funktion der rRNA sowie das Splicing bei der snRNA.

Die **tRNA** (engl. transfer-RNA) bezeichnet eine kurze Sequenz von etwa 73 bis 95 Nucleotiden mit einem kleinen Anteil an konjugierenden Basen. Dadurch entsteht die kleeblattartige Sekundärstruktur der tRNA. Die tatsächliche Form der tRNA ist eine L-förmige Tertiärstruktur, deren beide Arme den Aminosäure-Akzeptorstamm und die Anticodon-Schleife - eine exponierte Dreiergruppe von Nucleotiden - bilden. Die Aufgabe der tRNA besteht darin, zu jedem komplementären Basentriplett (Codon) auf der mRNA die passende Aminosäure zu den Ribosomen zu transportieren. Aufgrund der Kombinationsmöglichkeiten eines Basentriplets mit vier verschiedenen zur Verfügung stehenden Basen, gibt es insgesamt 64 verschiedene tRNAs. Da es aber nur 20 verschiedene Aminosäuren gibt, übertragen manche der tRNAs die gleiche Aminosäure. Man spricht von synonymen tRNA-Arten (Knippers, 1995).

Die **rRNA** (ribosomale RNA) beschreibt ein Struktur- und Funktionselement der Ribosomen. Die kleine Untereinheit eines Ribosoms besteht aus der 16S-rRNA mit 1.542 Nucleotiden und 21 verschiedenen Proteinen. Die große Untereinheit besteht aus zwei verschiedenen rRNA-Arten, einer 23S-rRNA aus 2.904 Nucleotiden und einer 5S-rRNA mit 120 Nucleotiden sowie 33 verschiedenen Proteinen. Die Bildung ausgedehnter intramolekularer Doppelhelix-Bereiche stellt ein besonderes Merkmal der rRNA dar. Diese Bereiche falten sich wiederum zu komplexeren, definierten, dreidimensionalen Strukturen. Die rRNA wird dadurch zu mehr als nur einem Bestandteil des ribosomalen Gerüsts. Sie leitet durch Bindung an ihre definierten Strukturen mRNA und tRNA in funktionell wichtige Positionen (Knippers, 1995).

Die **miRNA** (engl. micro RNA) ist eine sehr kurze, hochkonservierte, nicht-kodierende Sequenz von 21 bis 23 Nucleotiden, die regulative Wirkung auf die Gene hat, insbesondere auf das sogenannte "Gen-Silencing". Die miRNA bindet dabei an den 3'-UTR (untranslatierte Region) einer mRNA und je nach Komplementarität der Bindungssequenz und beteiligter Proteine wird die mRNA entweder an der Translation gehemmt oder in kleinere Fragmente zerschnitten und abgebaut (Degradation) (He & Hannon, 2004) (Wienholds & Plasterk, 2005).

Die **siRNA** (engl. small interfering RNA) ist ein 21 bis 28 Nucleotide langes Fragment und somit eine weitere Form von miRNA, die unter Einwirkung von RNase III aus doppelsträngigen RNAs herausgeschnitten wurde. Sie werden anschließend in den

Proteinkomplex RISC (engl. RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mit Hilfe der RNA-Fragmente kann dieser Komplex gezielt komplementär an eine mRNA binden und bewirkt eine Entwindung der mRNA-Struktur. In dieser offenen Form kann die mRNA schnell durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut werden. Die siRNA ist also ein weiterer Bestandteil der Genregulation und des Abbaus von inaktivierten mRNA-Transkripten oder Fremd-RNA (z.B. von Viren) (He & Hannon, 2004).

### **B.5.1 Transkription und Translation**

Der genetische Code, dargestellt durch die scheinbar zufällige Aneinanderreihung von vier verschiedenen Basen, hilft allen bekannten Lebewesen bei der Übersetzung von DNA-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen und ist weitestgehend universell. Eine Folge aus jeweils drei bestimmten Nucleotiden, sogenannten "Tripletts" oder Codons, der von der DNA abgeleiteten mRNA, kodiert für eine von zwanzig verschiedenen Aminosäuren. Bei vier verschiedenen Basen ergibt das 64 mögliche Tripletts. Daraus folgt, dass der Einbau einer Aminosäure durch mehrere Dreierkombinationen von Nucleotiden gesteuert wird. Der genetische Code ist degeneriert. Ausgenommen davon ist das Stopp-Codon, da es für das Ende des synthetisierten Polypeptids steht und keine tRNA dafür existiert, wodurch keine weitere Aminosäure angelagert wird (Renneberg, 2007).

Benötigt ein Organismus bzw. eine Zelle bestimmte Proteine, werden in den Ribosomen (Zellorganell) Aminosäuren dem genetischen Code entsprechend zu einer Polypeptid-Kette zusammengefügt. Der in der DNA hinterlegte Bauplan für die Proteine (Exons) ist meist von mehreren nicht zuzuordnenden, scheinbar sinnlosen Einschüben (Introns) und Sequenz-Wiederholungen unterbrochen. Um die Information, die den Bauplan eines Proteins beinhaltet, vom Zellkern zu den Ribosomen zu bringen, muss der entsprechende genetische Code zunächst in eine Transportform gebracht werden. Dazu wird eine Kopie des DNA-Abschnittes in Form einer mRNA synthetisiert. Das Enzym RNA-Polymerase öffnet blasenförmig den DNA-Doppelstrang und bindet an die Start-Sequenz des Gens. Sie wandert nun vom 5'- zum 3'-Ende des Gens und an die dabei frei werdenden Basen des DNA-Stranges

werden die entsprechenden komplementären Nucleotide (dNTPs - desoxy-Nucleotid-Tri-Phosphat) angelagert (Renneberg, 2007):

- an ein Adenin (A) der DNA ein Uracil (U),
- an ein Cytosin (C) der DNA ein Guanin (G),
- an ein Guanin (G) der DNA ein Cytosin (C) und
- an ein Thymin (T) der DNA ein Adenin (A) der RNA.

Der Tri-Phosphat-Anhang der dNTPs liefert dabei die Energie für den Syntheseprozess. Da bei der Transkription auch die Intron-Abschnitte der DNA abgelesen werden, diese aber keine für die Synthese eines Proteins wichtigen Informationen enthalten, werden diese durch Spleißen aus dem Primärtranskript entfernt. Die amplifizierte und gespleißte einzelsträngige mRNA trennt sich von der DNA und wandert aus dem Zellkern in das Cytosol. Dort lagern sich Unter- und Obereinheit der Ribosomen an die Promotor-Region der mRNA an. Die beiden Untereinheiten bilden zwei Kammern bzw. Bindungsstellen - Aminoacyl- oder Erkennungsort (A-Ort) und Peptidyl- oder Bindungsort (P-Ort). Zu Beginn der Translation befindet sich die sogenannten "Initiations-tRNA" mit ihrem zum Start-Codon (AUG 92 %, GUG und UUG 8 %) komplementären Anticodon im P-Ort und das nächstfolgende Triplet der mRNA im A-Ort. Allerdings stellt das Start-Codon nicht den Anfang der mRNA dar. Die mRNA beginnt immer mit einem Abschnitt, der dem AUG-Codon vorgeschaltet ist, der 5'-Nichtkodierungsbereich (5'-UTR). Dieser Bereich hat eine wichtige Funktion, welche die Einleitung der Translation betrifft. Ein Abschnitt von 5 bis 9 Nucleotiden vor dem AUG-Codon (Shine-Dalgarno-Sequenz) bildet eine komplementäre Verbindung mit der 16S rRNA des Ribosoms. Länge und Abstand dieses Abschnittes bestimmen die Stabilität der mRNA Bindung an das Ribosom. Zum freien A-Ort gelangt nun die zu dem sich dort befindenden Triplet komplementäre Aminoacyl-tRNA, die einen Komplex aus einem Elongationsfaktor (EF-Tu) und Guanisintriphosphat (GTP) bildet. Am Ribosom wird ein Phosphor-Atom vom gebundenen GTP abgespalten. EF-Tu/GDP wird dabei vom Ribosom und die Aminosäure Methionin wird von der Initiations-tRNA im P-Ort getrennt und bildet eine

Peptidbindung mit der nächsten Aminosäure, die noch mit der Aminoacyl-tRNA im A-Ort verbunden ist. Nach der Peptidbindung liegt die leere t-RNA im Ausgangsort (E-Ort) und eine Dipeptidyl-tRNA am A-Ort. EF-Tu katalysiert die darauf folgende Translokation und bewirkt zunächst die Abstoßung der leeren tRNA aus dem E-Ort und die Verlagerung der Dipeptidyl-tRNA vom A-Ort in den P-Ort. Das Ribosom bewegt sich dabei um die Länge eines Triplets entlang der mRNA (Knippers, 1995).

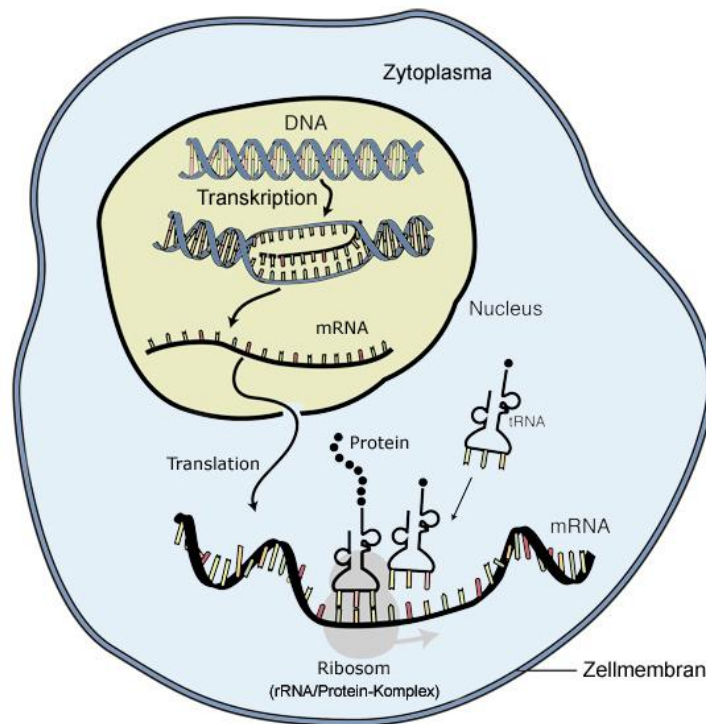
Es gibt Ribosomen, die frei im Cytosol liegen sowie an das endoplasmatische Reticulum (ER) gebundene Ribosomen. Der Ort der Synthese ist abhängig vom synthetisierten Protein. Proteine, die innerhalb der Zelle zum Einsatz kommen, werden an den freien Ribosomen synthetisiert und verbleiben in der Zelle. Proteine, die außerhalb der Zelle (z.B. im Blutkreislauf) zum Einsatz kommen und auch meist komplexere Strukturen haben, werden durch das ER in ihre endgültige Form gebracht und aus der Zelle transportiert. Besitzt das synthetisierte Protein am Anfang der Polypeptidkette ein Signalpeptid, wird es durch zwei Zellbestandteile zur ER-Membran dirigiert (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts & Watson, 1990):

- von einem Signal-Erkennungs-Partikel (SRP, signal-recognition particle), das zwischen ER-Membran und Cytosol hin- und herpendelt und an das Signalpeptid bindet
- und vom SRP-Rezeptor in der ER-Membran.

Bei diesem Vorgang bindet das SRP an das Signalpolypeptid und besetzt die A-Bindungsstelle des Ribosoms, wodurch die Translation verzögert oder teilweise sogar unterbrochen wird. Der gesamte Komplex wird zum ER gezogen, wo das SRP selektiv an den SRP-Rezeptor bindet. Durch diesen Prozess wird verhindert, dass das Protein fälschlicherweise ins Cytosol freigesetzt wird. Das SRP wird verdrängt und wiederverwendet, während die Translation wieder aufgenommen wird und der Transport des synthetisierten Proteins in das ER-Lumen beginnt. Abgeschlossen wird die Translation ebenso wie sie begonnen hat, durch eine spezielle Sequenz von drei Basen, dem sogenannten "Stopp-Codon" oder "Nonsense-Codon" (UAG, UAA



oder UGA). Für diese drei Stopp-Codons liegen keine komplementären tRNAs vor, wodurch ab diesem Punkt der mRNA keine weitere Aminosäure hinzugefügt wird. Das synthetisierte Protein ist entsprechend der genetischen Information der DNA komplett. Die Translation wird beendet (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts & Watson, 1990).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von Transkription und Translation in einer eukaryotischen Zelle (Quelle: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/96/Transkription\\_Translation\\_01.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/96/Transkription_Translation_01.jpg))

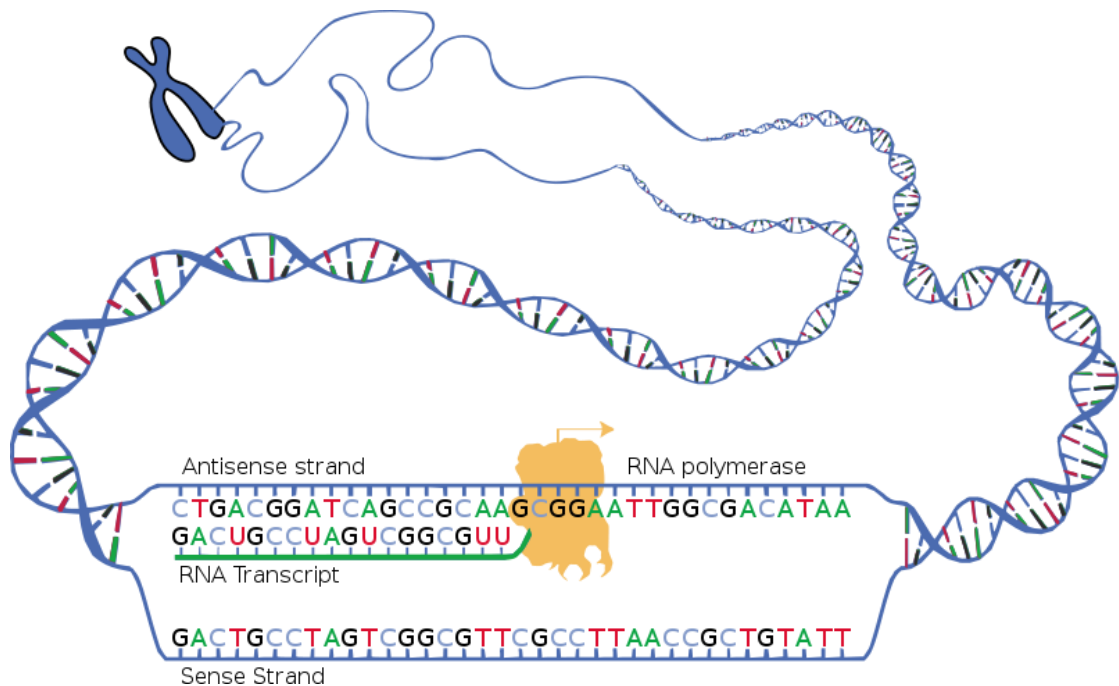
Nach Abschluss der Translation wird das Signalphosphatid vom Protein abgetrennt und das Protein wird über das ER für den Transmembrantransport vorbereitet. Dabei wird das Protein mit anderen Proteinen im ER zusammengebracht und in seine endgültige Form gebracht (z.B. ein Hormon oder Enzym). Eingeschlossen in Golgi-Vesikel, die aus dem ER hervorgehen, werden diese Transmembranproteine aus der Zelle transportiert (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, & Watson, 1990).

### B.5.2 Sense- und Antisense-RNA

Zur Beschreibung von Sense- und Antisense-RNA muss der Vorgang der Transkription genauer betrachtet werden. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden RNAs liegt darin, an welchem der beiden DNA-Stränge eines Doppelstranges sie synthetisiert werden. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass mRNAs nur am nicht-kodierenden bzw. Gegensinn-Strang (engl. antisense strand) transkribiert werden. Denn nur auf diese Weise entsteht eine zum kodierenden Strang homologe mRNA (siehe Abbildung 7: Translationshemmung durch *Antisense-Oligonucleotide*). Wird auch am nicht-codogenen Strang eine RNA transkribiert, entsteht eine zur mRNA komplementäre Antisense-RNA (aRNA), die homolog zum nicht-kodierenden Strang ist. Die aRNA inhibiert durch komplementäre Basenpaarung mit der mRNA die Translation in der Zelle. Auf diese Weise stellt die aRNA einen entscheidenden Faktor in der Regulation der Genexpression und folglich in der Proteinbiosynthese dar (Knippers, 1995; Schmid, 2006).

Im menschlichen Genom sind bisher ca. 1.600 Antisense-Gene bekannt, darunter z.B. IGF2 (engl. insulin-like growth factor 2), ein Wachstumsfaktor, der entscheidend bei der Steuerung von Wachstum und Differenzierung von Gewebezellen (z.B. Leber und Pankreas) mitwirkt. Würde die mRNA, die für dieses Protein codiert, nicht durch eine komplementäre aRNA reguliert werden, könnte dies zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen, wie es bei Krebserkrankungen der Fall ist. Bei der Untersuchung von expressions-regulierenden Antisense-Systemen in Prokaryoten, hat man festgestellt, dass einige Proteine eine potenzierende Wirkung auf die Interaktionen zwischen Sense- und Antisense-RNAs haben. Bei Eukaryoten hingegen wurde ein Protein (engl. unwindase) gefunden, dass die komplementäre Bindung zwischen Sense- und Antisense-RNA auflöst. Das Protein erkennt doppelsträngige RNAs und konvertiert einige der Adenosin-Nucleotide durch hydrolytische Desaminierung in Idinosin-Nucleotide, wodurch der Doppelstrang destabilisiert wird. Durch Auflösung der doppelsträngigen Bindung kann die mRNA wieder in ein Protein umgeschrieben werden. Entdeckt wurden solche Proteine bisher nur in menschlichen HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Gebärmutterhalskarzinoms) und in *Xenopus* Oozyten (Krallenfrosch-Eizellen). Dieses Protein ist insbesondere für

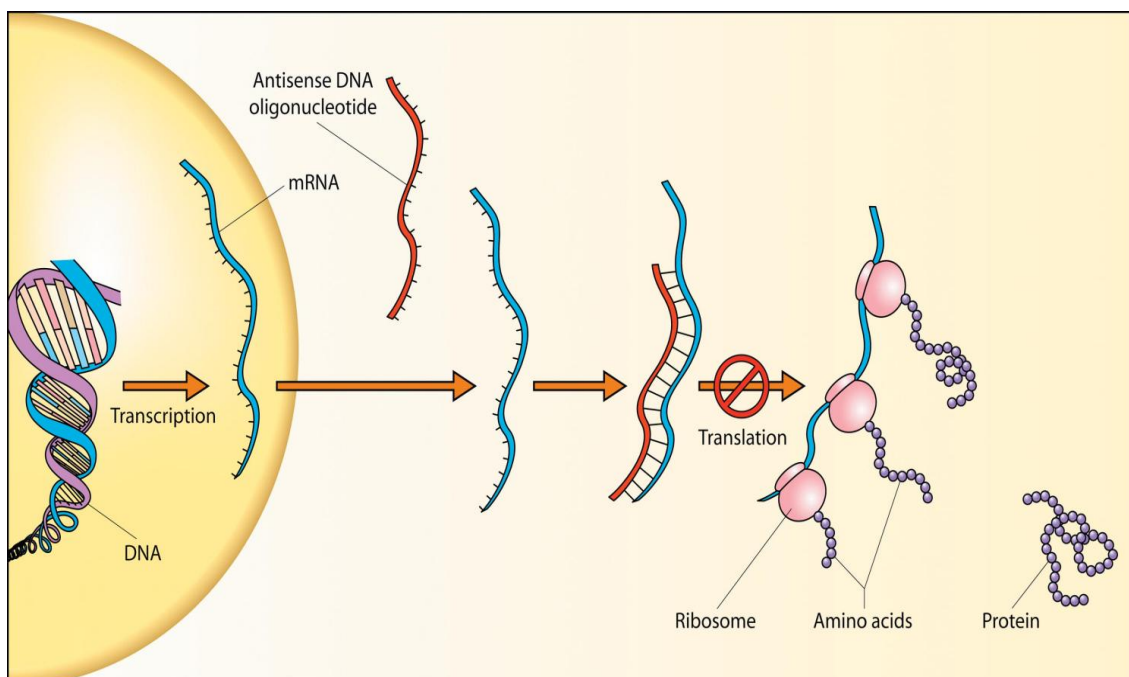
die Anwendung synthetischer Antisense-Oligonucleotide zur gezielten Hemmung von Sense-Transkripten in der Forschung von Bedeutung (s.u.) (Case & Dhundale, 1991).



**Abbildung 6:** *Transkription einer Sense-RNA* (Quelle: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/36/DNA\\_transcription.svg/800px-DNA\\_transcription.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/36/DNA_transcription.svg/800px-DNA_transcription.svg.png))

Die genregulierende Funktion der aRNA findet bereits seit mehreren Jahren Anwendung in der Forschung. Bei der Entwicklung von Gentherapien in der Medizin, bei der Züchtung transgener Tiere und Pflanzen sowie bei der Stammentwicklung von Mikroorganismen wird darauf abgezielt mit Hilfe synthetischer Oligonucleotide (Antisense-DNA), bestimmte Transkripte systematisch zu hemmen, um unerwünschte Eigenschaften zu eliminieren. Zur Inhibierung eines bestimmten Gens

wird die Nucleotidsequenz dieses Gens in revers-komplementärer Richtung in einen Expressionsvektor kurz hinter einen Promotor ligiert und für eine Transformation verwendet. Die bei der Transkription dieses Vektors entstehende aRNA ist komplementär zur normalen mRNA dieses Vektors und verhindert die Synthese des Genproduktes (siehe Abbildung 7: Translationshemmung durch Antisense-Oligonucleotide). Der dabei entstehende RNA-Doppelstrang kann nicht an den Ribosomen binden und wird zu zelleigenen Ribonucleasen abgebaut. Allerdings findet diese Technik der Molekularbiologie bei den Phänotypen ihre Grenzen, da diese auf mehreren Genfunktionen beruhen (Schmid, 2006). Des Weiteren hat man herausgefunden, dass die Translation nur dann inhibiert werden kann, wenn die synthetischen Oligonucleotide einen Bereich von 18 Basen um das Initiations-Codon der mRNA blockieren. Dieser Bereich entspricht der durch ein Ribosom geschützten Region. Zielen die Antisense-Oligonucleotide auf einen Bereich außerhalb dieser Region, sind die Ribosomen nach Beginn der Translation in der Lage, die komplementären Bindungen im doppelsträngigen Bereich aufzulösen (Case & Dhundale, 1991).



**Abbildung 7:** *Translationshemmung durch Antisense-Oligonucleotide* (Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Antisensedna.jpg>)

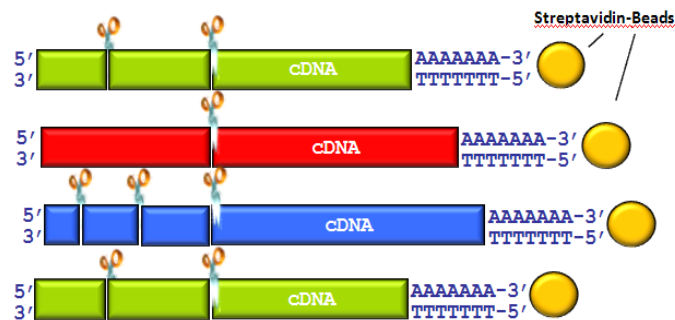
## B.6 SuperSAGE-Technologie

Zum Verständnis der massiven Veränderungen sowie zur Abgrenzung der genetischen Veränderungen des Pankreaskarzinoms im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und zu gesundem Pankreasgewebe ist es notwendig, die beteiligten Gene zu identifizieren, deren Expression zu messen und die verschiedenen Zustände zu vergleichen. Alleine durch die Information der Nukleotidsequenz können diesbezüglich keine Schlüsse gezogen werden.

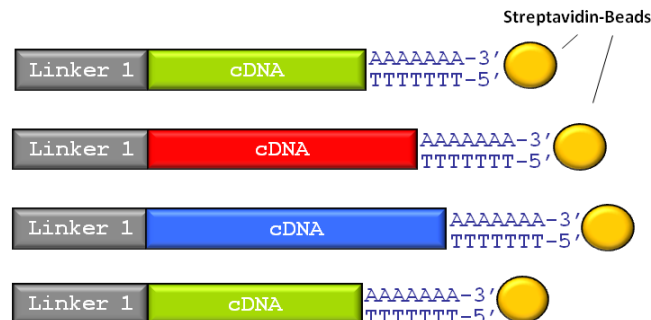
Das von Velculescu *et al.* (1995) entwickelte SAGE-Verfahren (Serial Analysis of Gene Expression) bietet die Möglichkeit, selbst unbekannte Transkripte zu erfassen und qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Dabei wird enzymatisch von jedem in cDNA umgeschriebenen Transkript ein 14 bp Fragment herausgeschnitten, welches die jeweilige mRNA repräsentiert. Mittels dieser sogenannten "Tags" wird eine Quantifizierung der mRNA-Transkripte möglich. Eine Weiterentwicklung von SAGE ist die in Abbildung 8 dargestellte SuperSAGE-Technologie. Der Vorteil von SuperSAGE im Vergleich zu ihrem Vorgänger besteht darin, dass der 14 bp Tag durch den Einsatz eines anderen Enzymes (EcoP15) auf eine Größe von 26 bp gesteigert wird. Dadurch wird die statistische Sicherheit erhöht, dass der Tag das exprimierte Gen eindeutig charakterisiert (Matsumura *et al.* 2008). Zur weiteren Analyse wird aus je zwei Tags ein Ditag gebildet, um eine genaue Quantifizierung zu gewährleisten und PCR-Artefakte zu vermeiden. Die Ditag-Bildung mit Basenpaarung am 5'-Ende stellt sicher, dass es sich stets um zufällige Paarung von je zwei unterschiedlichen 26 bp Tags handelt. Somit entsteht in der anschließenden PCR keine sequenzabhängige Präferenz, die ein exaktes Quantifizierungsergebnis verfälschen würde (Matsumura *et al.* 2003).

Hunderttausende dieser Ditags werden anschließend sequenziert und gezählt. Dadurch erhält man eine Antwort auf die Frage, wie viele Transkripte welchen Gens wie häufig im untersuchten Gewebe vorkommen.

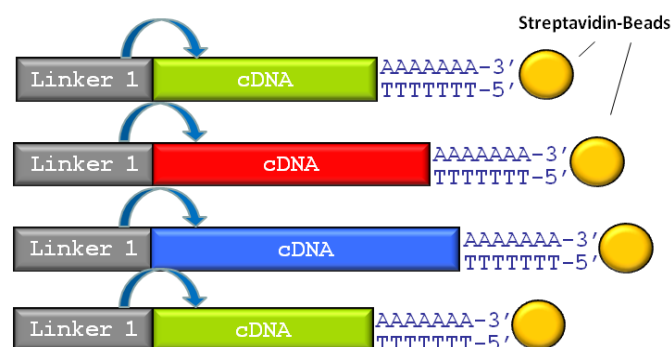
Das SuperSAGE-Verfahren funktioniert wie folgt:



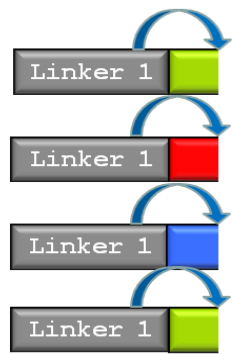
1. Verdauung der DNA durch Anchoring-Enzyme (schneidet gezielt an einer definierten Erkennungssequenz)



2. Ligation von Bindungssequenzen (Linker)



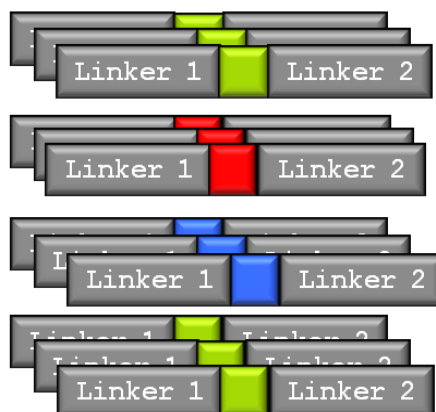
3. Verdauung durch Tagging-Enzyme (schneidet gezielt nach einer bestimmten Anzahl an Basen hinter einer definierten Erkennungssequenz, die sich am 3'-Ende des Linker1 befindet)



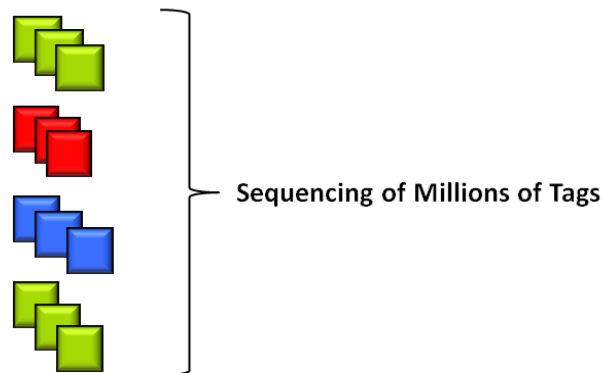
#### 4. Rückgewinnung der gebundenen Tags



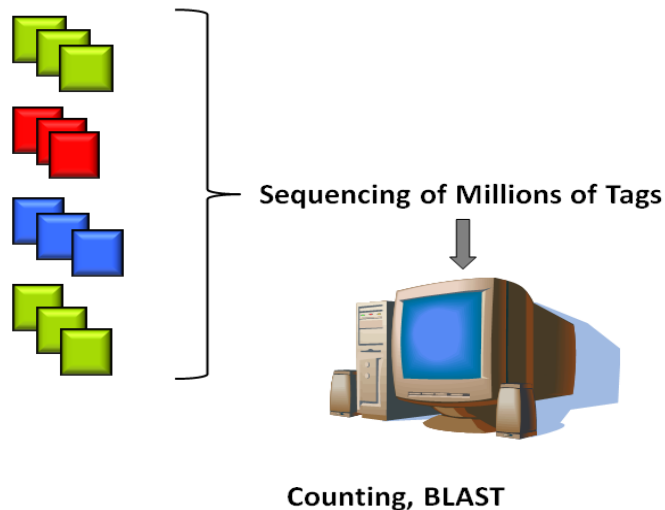
#### 5. Zweite Ligation mit Bindungssequenzen



#### 6. Vervielfältigung durch PCR



## 7. Sequenzierung der Tags



## 8. Auszählung der Tags, Vergleich mit Datenbanken (nur wenn bereits bekannt) und weitere bioinformatische Analysen

**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des SuperSAGE Verfahrens  
(Quelle: GenXPro GmbH, Dr. Björn Rotter, 2008)

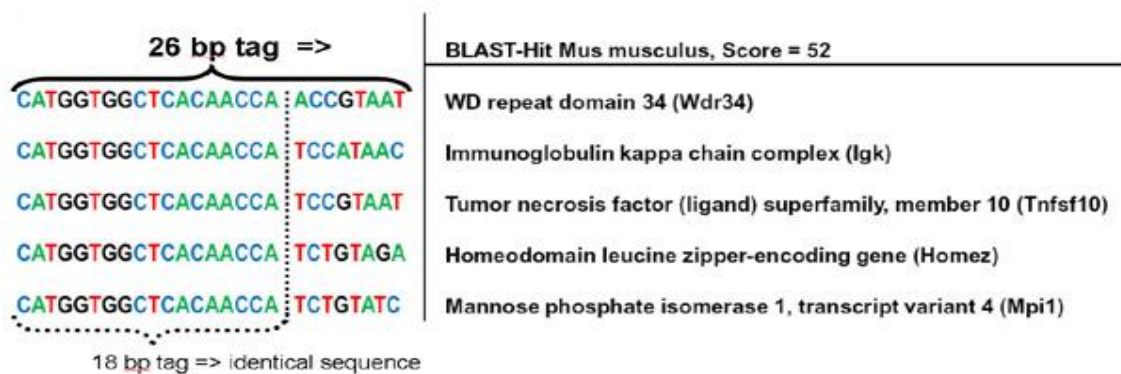
Die in cDNA umgeschriebenen mRNA Transkripte des zu untersuchenden Gewebes werden an Streptavidin-Beads gebunden. Anschließend wird mit dem Tagging Enzym ein spezifischer 26 bp Tag gewonnen. Diese werden zu Ditags ligiert, welche



wiederum sequenziert und gezählt werden. Die Unterschiede in der Genexpression können durch die Ermittlung des Verhältnswertes (engl. ratio,  $r$ ) berechnet werden. Dabei wird für die Stress-Situation sowie für die Kontrolle die Kopienzahl des jeweiligen Tags mit der entsprechenden Gesamtzahl aller Tags ins Verhältnis gesetzt. Der natürliche Logarithmus des Quotienten dieser Verhältnswerte ( $V_1$  und  $V_2$ ) ergibt den  $r$ -Wert.

### B.6.1 Vorteile von SuperSAGE

Durch Verwendung eines längeren und damit besser zu annotierenden 26 bp langen Tag, anstelle eines nur 14 bis 18 bp langen Tag in Kombination mit neuen Sequenzier-Technologien überwindet *SuperSAGE* die zwei Hauptnachteile seiner Vorgängertechniken – geringe Genauigkeit und hohe Kosten (siehe Abbildung 9: *Genauigkeit eines 26 bp gegenüber einem 18 bp Tag*) (Matsumura et. al, 2008).



**Abbildung 9:** Genauigkeit eines 26 bp gegenüber einem 18 bp Tag (Quelle: GenXPro GmbH, Dr. Björn Rotter, 2008)

Der Gewinn von seltenen und unbekannten Transkripten stellt einen großen Vorzug der SuperSAGE-Technologie gegenüber anderen Methoden dar, die sich ebenfalls zur Messung der Genexpression eignen wie z.B. Mikro-Arrays. Gerade die seltenen mRNAs in einem Gewebe mit nur einer bis fünf Kopien pro Zelle machen 80 bis 95 %

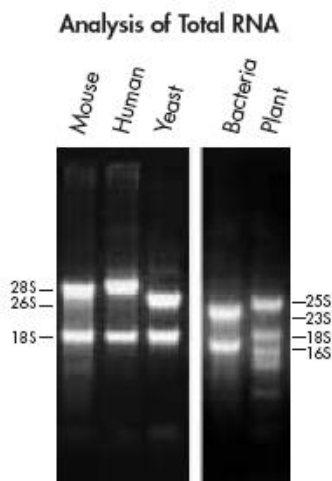
der Vielfalt aus. Darunter befinden sich viele regulatorische Elemente, die für die Funktion der Zelle verantwortlich sind. Mit Hilfe von SuperSAGE können auch diese seltenen Transkripte erfasst werden.

Herkömmlicherweise werden aus den Tags durch eine „Kopf an Kopf“ - Ligation „Ditags“ gebildet, bevor weiterführende PCR's und Sequenzierungen vorgenommen werden. Vor der Bildung dieser Ditags sollten die Tag Fragmente mit „stumpfen Enden“ (engl. blunt ends) versehen werden, um somit präferentielle Ligationen zu verhindern. Die Erzeugung von Ditags durch zufällige Kombination der Tag-Fragmente ist für eine quantitative Genexpressionsanalyse unerlässlich. Nach der Sequenzierung werden doppelt oder mehrfach vorkommende Ditags durch Prozessfilter bioinformatisch entfernt, bevor weitere Analysen durchgeführt werden. Die längeren SuperSAGE-Tags verbessern die Effizienz der Tag – Gen Annotationen (Identifikation der zugehörigen Gene der tags) dramatisch. Bei Modellorganismen, von denen genomische oder cDNA Datenbanken existieren, erlauben die 26 bp tags eine nahezu perfekte Gen-Annotation durch einen Abgleich (BLAST) mit der Datenbank. Ein zusätzlicher Vorteil der 26 bp langen SuperSAGE-Tags ist, dass die DNA Sequenz der zugehörigen Gene leicht mittels PCR wiedererlangt werden kann. Dies erlaubt sogar die Analyse von Transkripten in Organismen von denen keine Sequenzinformationen in Datenbanken existieren (Matsumura et. al, 2008).

## **B.7 RNA-Qualität und Integrität**

Eine sofortige Stabilisierung der RNA in biologischen Proben ist notwendig, da sich direkt nach dem Erhalt dieser Proben das Genexpressionsmuster aufgrund von spezifischer und unspezifischer RNA Degradation verändert. Solche Veränderungen müssen für alle zuverlässigen und quantitativen Genexpressionsanalysen wie z.B. Microarray-Analysen, quantitative RT-PCR, TaqMan® und LightCycler® sowie andere Nukleinsäure basierten Technologien verhindert werden.

Die Konzentration der RNA sollte durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) in einem Spektrometer unter der Verwendung von Quarzküvetten ermittelt werden. Übliche Werte liegen zwischen 0,15 und 1,0. Eine Absorption von 1 bei 260 nm und neutralem pH entspricht in etwa 40 µg RNA je ml Lösung. Das Verhältnis der Messwerte der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) lässt auf die Reinheit der RNA im Bezug auf Kontaminationen, wie z.B. Proteine, die im UV-Bereich absorbieren, schließen. Da dieses Absorptionsverhältnis deutlich vom pH beeinflusst wird, sollte dieser mit gering konzentrierten und leicht alkalischen Pufferlösungen angepasst werden. Die Integrität und Größenverteilung der Gesamt-RNA kann mit einer Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung verifiziert werden, wobei die entsprechenden charakteristischen Banden deutlich sichtbar sind. Die ribosomale 28S-RNA Bande sollte mit der doppelten Intensität der 18S-Bande der rRNA auftreten. Wenn ribosomale Banden einer bestimmten Probe nicht als scharfe Bande sondern schmierförmig erscheinen, so kann man von einer RNA-Degradation ausgehen.



**Abbildung 10:** Formaldehyd-Agarosegel von Gesamt-RNA aus verschiedenen Organismen (Quelle: QIAGEN, 2001)

Zu sehen sind die jeweils charakteristischen Banden für jeden Organismus. Die Schärfe der Banden deutet auf eine intakte RNA hin.

Formaldehyd-Agarosegele erlauben die Auftrennung und Identifizierung von RNA basierend auf Ladungsmigration. Anders als bei DNA hat RNA einen hohen Anteil an Sekundärstrukturen, was ein denaturierendes Gel notwendig macht. Formaldehyd im Gel löst die RNA Sekundärstrukturen auf, so dass die RNA Moleküle durch Ladungsmigration getrennt werden können. Im elektrischen Feld wandern Nukleinsäuremoleküle durch die negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung

Anode. Die Wanderung der denaturierten RNA-Moleküle wird durch ihre Größe bestimmt, jedoch ist das Verhältnis zwischen der Fragmentgröße und dem Wanderungsweg nicht linear, da größere Fragmente einer stärkeren Reibungskraft ausgesetzt sind und schlechter im Gel wandern können. Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die im Allgemeinen keine Kofaktoren für Ihre Funktion und Aktivität benötigen. Diese RNasen sind nur schwer zu deaktivieren und minimale Mengen reichen aus, um RNA zu degradieren. Dies spielt eine wichtige Rolle bei den verschiedenen RNA Isolationsverfahren und bei deren späteren Handhabung und Aufbewahrung, da die enzymatische Aktivität der RNasen stets zu vermeiden ist, um eine gute RNA Qualität zu erzielen.

Eine typische Säugerzelle enthält 10 bis 30 pg an Gesamt-RNA wobei die Mehrheit der RNA-Moleküle tRNAs und rRNAs sind. Die mRNA entspricht nur 1 bis 5 % der Gesamtmenge an zellulärer RNA, obwohl die aktuelle Menge vom Zelltyp und dessen physiologischem Zustand abhängt. Ungefähr 360.000 mRNA-Moleküle befinden sich in einer einzigen Säugerzelle und werden aus ungefähr 12.000 Transkripten mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 2.000 Basen gebildet. Manche dieser mRNAs umfassen 3 % des gesamten mRNA-Pools, wohingegen andere weniger als 0,01 % davon ausmachen. Diese seltenen oder gering vorhandenen Moleküle haben wahrscheinlich eine Anzahl von nur 5 bis 15 Kopien an Molekülen pro Zelle. Diese seltenen Spezies können sich bis auf 11.000 aufsummieren und bis 45 % der gesamten mRNA-Population ausmachen.

Nach der Probenahme wird das Gewebe sofort in RNAlater, ein effektives RNA Stabilisierungsreagenz, gegeben, welches schnell in das Gewebe eindringt, um zelluläre RNA in-situ zu stabilisieren und zu schützen. Diese Reagenz bewahrt RNA langfristig auf, wodurch Transport und Lagerung der Proben auch ohne Eis oder Trockeneis möglich ist, da diese stets intakt bleibt und nicht degradiert. Die RNAlater-Technologie erlaubt einer großen Anzahl an Proben leicht verarbeitet zu werden und ersetzt unvorteilhafte, gefährliche und materialaufwenige Methoden, wie z.B. schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80°C, Schneiden und Wiegen auf Trockeneis, oder unmittelbare Verarbeitung frisch genommener Proben (Quiagen - RNeasy® Mini Handbook).

## C. MATERIAL

### C.1 Chemikalien

2x OneStep qRT-PCR Puffer	Clontech Laboratories, Mountain
2x Power SYBR Green Master Mix Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt
5x Taq-Puffer	Bioline, Luckenwalde
5x First-Strand-Puffer	Fermentas GmbH, ST. Leon-Rot
10x PCR-Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x TdT-Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin 99 %	Roth, Karlsruhe
Borsäure $\geq 99,8$ %	Roth, Karlsruhe
$\text{CoCl}_2$	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dATP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ddH <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
DNaseI (1 U/ $\mu$ l)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Elution Buffer	Qiagen, Hilden
Ethanol 99 %	Roth, Karlsruhe
Exonuklease I (E.coli)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Hyperladder V	Bioline, Luckenwalde
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid ( <i>IPTG</i> )	BTS GmbH, St. Leon-Rot
Isopropanol 70 %	Roth, Karlsruhe
Ladder-Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
LB- Medium (Luria Bertani)	Roth, Karlsruhe
Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Mangotag DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	Bioline, Luckenwalde
Polyacrylamid (PAA 8 %)	Roth, Karlsruhe
Polynucleotid-Kinase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase - Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ribo Lock (RNase Inhibitor)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RLT – Puffer	Qiagen, Hilden
RNAlater	Qiagen, Hilden
RNase H	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
SureClean Plus	Bioline, Luckenwalde
T4-DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-Ligase-Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Terminale Transferase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TRIS Ultra Qualität $\geq 99,9$ %	Roth, Karlsruhe
X – Gal	BTS GmbH, St. Leon-Rot

## C.2 Geräte

Autoklav HICLAVE™ HV- 50L	HMC Europe, Tüßling
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
DigiPrint R 3000	Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen
Electrophoresis power supplies E 862	Consort, Turnhout, Belgien
Gelkammer Model: 41-2340	Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen
Nanophotometer	Implen GmbH, München
Step One Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermoblock ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Navigator™	Ohaus, USA
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, USA

### Thermocycler:

Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Primus 96 advanced	Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen

### Zentrifugen:

Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

Maxwell® 16 LEV Instrument	Promega, Mannheim
Vac-Man® Vakuumkammer	Promega, Mannheim

### C.3 Kits

Baseline-ZERO™ DNase USA	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
ExactSTART™ Full-Length USA	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
cDNA Library Cloning Kit USA	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
Nucleo Spin - RNA Clean Up XS	Macherey-Nagel, Düren
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
Sprint™ RT Complete	Clontech Laboratories, Mountain View, USA
SuperScript. III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Darmstadt

### C.4 Lösungen und Puffer

#### Luria-Bertani (LB) Agarplatten (25g/l LB- Medium):

15g/l Agar-Agar

100ng/μl Ampicillin

50mg/ml X-Gal

0,1M IPTG

#### 20x TBE-Puffer:

1M Tris

1M Borsäure



20mM EDTA

10x TE-Puffer:

100mM Tris-HCl pH 8

10mM EDTA pH 8

1,5 % Agarose:

1,8g Agarose/100ml

Ethidiumbromid-Färbelösung:

0,5 µg EtBr/100ml ddH<sub>2</sub>O

SOC-Medium (100ml):

2,5 g LB- Medium

1 ml 1M NaCl

0,25 ml 1M KCl

1 ml 2M Mg<sup>2+</sup>

1 ml 2M Glucose

auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O

## C.5 Probenmaterial

**Tabelle 1: Gesamt-RNA-Probenmaterial verschiedener Spender**

Diagnosis	HD NO	Caliper Conc. total RNA (ng/µl)	Caliper total RNA amount (µg)	1 <sup>st</sup> SSAGE experim. µg, (µl)	2 <sup>nd</sup> SSAGE experim. µg, (µl)	Volume (µl) after DNaseI Treatm.	Repet. SSAGE For RACE 09/09	Total RNA left µg, (µl) 09/09
CP	41,1	278	40,31	12,5 (44,96)	10 (35,97)	145	1 µg = 3,6 µl	16,81 (60,47)
CP	481	99	14,355	12,5 (126,26)	-	145	-	1,85 (18,74)
CP	871	909	131,805	12,5 (13,75)	10 (11)	145	1 µg = 1,1 µl	90,125 * (99,15)
CP	14,1	903	130,935	12,5 (13,84)	10 (11,07)	145	1 µg = 1,1 µl	106,85 (118,99)
						<b>Total volume:</b>	<b>5,8 µl = 3 µg</b>	
Donor	1303,1	633	34,815	4 (6,32)	2,5 (3,95)	55	0,75 µg = 1,2 µl	27,56 (43,53)
Donor	1395,1	91	5,005	4 (43,95)	-	55	-	1,005 (11,05)
Donor	427,3	206	11,33	4 (19,42)	2,5 (12,14)	55	0,75 µg = 3,7 µl	4,08 (19,74)
Donor	388,1	735	50,425	4 (5,44)	2,5 (3,4)	55	0,75 µg = 1 µl	28,425 * (25,16)
Donor	1366,1	759	41,745	4 (5,27)	2,5 (3,3)	55	0,75 µg = 1 µl	34,495 (45,43)
						<b>Total volume:</b>	<b>6,9 µl = 3 µg</b>	
IPMT	472,1	106	20,67	2,5 (23,58)	2,5 (23,58)	195	0,6 µg = 5,7 µl	15,07 (142,14)
IPMT	159,2	236	34,22	2,5 (10,59)	2,5 (10,59)	145	0,6 µg = 2,6 µl	28,62 (121,22)
IPMT	718,2-1	24	3,48	-	-	145	-	-
IPMT	718,2-2	27	3,105	2,5 (92,59)	-	115	-	0,605 (22,41)
IPMT	373,1-1/373,1-2	39,73	10,33	2,5 (62,89)	2,5 (62,92)	260	0,6 µg = 15,1 µl	4,73 (119,09)
IPMT	104,2	106	15,37	2,5 (23,58)	2,5 (23,58)	145	0,6 µg = 5,7 µl	9,77 (92,14)
IPMT	776,2	402	58,29	2,5 (6,22)	2,5 (6,22)	145	0,6 µg = 1,5 µl	44,65 * (111,06)
						<b>Total volume:</b>	<b>30,6 µl = 3 µg</b>	

Diagnosis	HD NO	Caliper Conc. total RNA (ng/µl)	Caliper total RNA amount (µg)	1 <sup>st</sup> SSAGE experim. µg, (µl)	2 <sup>nd</sup> SSAGE experim. µg, (µl)	Volume (µl) after DNaseI Treatm.	Repet. SSAGE For RACE 09/09	Total RNA left µg, (µl) 09/09
Tumor	282	189	36,855	5 (26,45)	3,5 (18,52)	195	0,75 µg = 4,0 µl	23,825 * (126,03)
Tumor	204,2	47	6,81	5 (106,38)	-	145	-	1,81 (38,62)
Tumor	262	100	14,5	5 (50)	3,5 (35)	145	0,75 µg = 7,5 µl	5,25 (52,5)
Tumor	63,1	174	25,23	5 (28,73)	3,5 (20,11)	145	0,75 µg = 4,3 µl	15,98 (91,86)
Tumor	155,1	102	14,79	5 (49,01)	3,5 (34,31)	145	0,75 µg = 7,4 µl	5,54 (54,28)
						Total volume:	23,2 µl = 3 µg	

CP Chronische Pankreatitis  
Donor gesundes Pankreasgewebe  
IPMT Intraduktales papilläres muzinöses Tumor  
Tumor Pankreas-Tumorgewebe

## C.6 Sonstige Materialien

Agarplatten  
*E. coli* JM109 (Promega)  
*E. coli* DH5α  
Klenow-Fragment  
Oligo(dT)-Primer  
Random Hexamers  
Rasierklingen  
selbsterstellte Primer (Biolegio)  
UV-Tisch

## D. METHODEN

### D.1 BLAST-Analysen von SUPERTAGS- und genomischen Sequenzen in öffentlichen Datenbanken

Mit den im Verlauf des SuperSAGE-Durchgangs erzeugten SuperTags kann ein Expressionsprofil angelegt werden. Die an einer definierten Stelle des 3'-Endes gewonnenen 26 bp langen Fragmente repräsentieren die gesamte mRNA des zu untersuchenden Gewebes. Anhand der enthaltenen Sequenzinformationen der Tags können Rückschlüsse auf die gen-codierenden Bereiche gezogen werden, da bekannte und charakterisierte längere Sequenzen, sogenannte "ESTs" (Expressed Sequence Tags), in Datenbanken verfügbar sind. Auf Grundlage dieser ESTs werden die entsprechend codierten Proteine ermittelt (annotiert).

Nach Eingabe einer SuperTag-Sequenz in eine Suchmaske, liefert die Datenbank eine Auswahl an Transkripten und genomischen Sequenzen, sortiert nach den Übereinstimmungen ihrer Sequenz mit der des SuperTags (siehe Abbildung 11: *Beispiel für das Ergebnis eines NCBI-BLAST*). Anhand des Erwartungswertes (e-value) kann eine Auswahl unter den gefundenen Sequenzen getroffen werden. Der e-value beschreibt dabei die Übereinstimmung der einzelnen Sequenzen in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz. Je niedriger der e-value, desto signifikanter ist der Treffer bei der Suche in der Datenbank. Diesen Vorgang des Vergleichs nennt man Alignment. In der Regel liefert das BLAST-Ergebnis nur eine einzige vollkommene Übereinstimmung bei den Transkripten. Folgt man dem Link dieses Transkriptes, gelangt man zum Datenbankeintrag dieser Sequenz, der umfangreiche Daten und Literaturverweise zur Sequenz und dem von ihr codierten Protein enthält. Um die Sequenz des Transkriptes darzustellen, wurde FASTA als einheitliches Format gewählt.

In der ersten Zeile steht hinter einem ">" ein Bezeichner für eine Sequenz, in den weiteren Zeilen folgt die Sequenz selbst. Leerzeilen werden überlesen (siehe Abbildung 12: *Darstellung einer Transkript-Sequenz im FASTA-Format*).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<b>Transcripts</b>							
<a href="#">NM_001754.4</a>	Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant	<a href="#">52.0</a>	52.0	100%	1e-05	100%	<a href="#">GM</a>
<a href="#">NM_001001890.2</a>	Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant	<a href="#">52.0</a>	52.0	100%	1e-05	100%	<a href="#">GM</a>
<a href="#">NM_00415.2</a>	Homo sapiens islet amyloid polypeptide (IAPP), mRNA	<a href="#">32.2</a>	32.2	61%	9.4	100%	<a href="#">GM</a>
<b>Genomic sequences</b> <a href="#">[show first]</a>							
<a href="#">NT_011512.11</a>	Homo sapiens chromosome 21 genomic contig, GRCh37 reference primary	<a href="#">52.0</a>	833	100%	1e-05	100%	
<a href="#">NW_001838706.1</a>	Homo sapiens chromosome 21 genomic contig, alternate assembly (based	<a href="#">52.0</a>	669	100%	1e-05	100%	
<a href="#">NT_011630.14</a>	Homo sapiens chromosome X genomic contig, GRCh37 reference primary	<a href="#">34.2</a>	60.5	92%	2.4	100%	
<a href="#">NT_029419.12</a>	Homo sapiens chromosome 12 genomic contig, GRCh37 reference primary	<a href="#">34.2</a>	1375	100%	2.4	100%	
<a href="#">NT_008705.16</a>	Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, GRCh37 reference primary	<a href="#">34.2</a>	514	100%	2.4	100%	
<a href="#">NT_007933.15</a>	Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, GRCh37 reference primary	<a href="#">34.2</a>	1506	100%	2.4	100%	
<a href="#">NT_007592.15</a>	Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37 reference primary	<a href="#">34.2</a>	1086	100%	2.4	100%	

**Abbildung 11:** Beispiel für das Ergebnis eines NCBI-BLAST (Quelle: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

```
>gi|169790829|ref|NM_001754.4| Homo sapiens runt-related transcription factor 1
(RUNX1), transcript variant 1, mRNA
CTTTGGGCGCTCATAAACAACCACAGAACCACAAGTTGGGTAGCCTGGCAGTGTGAGAGTCTGAACCCAG
CATAGTGGTCAGCAGGCAGGACGAATCACACTGAATGCAAACCACAGGGTTTCGCAGCGTGGTAAAGAA
ATCATTGAGTCCCCCGCCTTCAGAAGAGGGTGCATTTTCAGGAGGAAGCGATGGCTTCAGACAGCATATT
TGAGTCATTTCTTCGTACCCACAGTGTTCATGAGAGAATGCATACTTGAATGAATCCTTCTAGAGAC
GTCCACGATGCCAGCAGAGCCGCCGCTTCACGCCGCGCTCCACCGCGCTGAGCCCAGGCAAGATGAGCG
AGGCGTTGCGGCTGGGCGCCCCGGACGCCGCGCTGCCCTGGCCGGCAAGCTGAGGAGCGGCGACCGCAG
CATGGTGGAGGTGCTGGCCGACCAACCGGGCGAGCTGGTGCACCGACAGCCCCAACTTCTCTGTCTCC
GTGCTGCCTACGCACTGGCGCTGCAACAAGACCTGCCCATCGCTTTCAAGGTGGTGGCCCTAGGGGATG
TTCCAGATGGCACTCTGGTCACTGTGATGGCTGGCAATGATGAAACTACTCGGCTGAGCTGAGAAATGC
TACCGCAGCCATGAAGAACCAGGTTGCAAGATTTAATGACCTCAGGTTTGTGGTTCGAAGTGAAGAGGG
AAAAGCTTCACTCTGACCATCACTGTCTTCAAAACCCACCGCAAGTCGCCACCTACCACAGAGCCATCA
AAATCACAGTGGATGGGCCCCGAGAACCTCGAAGACATCGGCAGAACTAGATGATCAGACCAAGCCCGG
GAGCTTGTCTTTTCCGAGCGGCTCAGTGAAGTGGAGCAGCTGCGGCGCACAGCCATGAGGGTCAGCCCA
CACCACCCAGCCCCACGCCAACCTCGTGCCTCCTGAACCACTCCACTGCCTTTAACCTCAGCCTC
AGAGTCAGATGCAGGATACAAGGCAGATCCAACATCCCCACCGTGGTCTACGATCAGTCTACCAATA
CCTGGGATCCATTGCCTCTCCTTCTGTGACCCAGCAACGCCATTTACCTGGACGTGCCAGCGGCATG
ACAACCCTCTCTGCAGAACTTCCAGTCGACTCTCAACGGCACCCGACCTGACAGCGTTCAGGACCCGCG
GCCAGTTCGCCGCGCTGCCCTCCATCTCCGACCCCGCATGCACTATCCAGGCGCCTTCACTACTCCCC
GACGCCGCTCACCTCGGCATCGGCATCGGCATGTGCGCATGGGCTCGGCCACGCGCTACCACACCTAC
CTGCCGCGGCCCTACCCCGGCTCGTCGCAAGCGCAGGGAGGCCCGTTTCAAGCCAGCTCGCCCTCCTACC
ACCTGTACTACGGCGCCTCGGCCGCTCCTACCACTTCTCCATGGTGGGCGGCGAGCGCTCGCCGCCGCG
CATCTGCGCGCTGCACCAAGCGCTCCACGGCTCCGCGCTGCTCAACCCAGCCTCCGGAACAGAGC
GACGTGGTGGAGGCCGAGGGCAGCCACAGCAACTCCCCACCAACATGGCGCCCTCCGCGCGCTGGAGG
AGGCCGTGTGGAGGCCCTACTGAGGCGCCAGGCTGGCCCGCTGGGCCCGCGGGCGCGCCCTTCGCC
TCCGGCGCGCGGGCTCCTGTTTCGCGACAAGCCCGCGGGATCCCGGGCTTGGGCCCGGCCACCGTCC
```

**Abbildung 12:** Darstellung einer Transkript-Sequenz im FASTA-Format (Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/169790829?report=fasta&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/169790829?report=fasta&log$=seqview))

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Auswahl der SuperTags herangezogen, die einerseits keinen bzw. nur einen sehr geringen Unterschied in der Genexpression zwischen den vier verschiedenen Zuständen (CP, Donor, IPMT, Tumor) aufweisen. Dieses Erscheinungsbild wird konstitutiv genannt und die zu diesen Transkripten zugehörigen Genexpressionswerte sollen später als Referenz für die relative Quantifizierung dienen (siehe Tabelle 5: *Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse von 7 konstitutiven Sense-Kandidaten für qPCR*). Andererseits sollten differentiell exprimierte SuperTags bei allen vier Zuständen gefunden werden, um die Wirkung der von chronischer Pankreatitis und Bauchspeicheldrüsenkrebs auf die Genexpression aufzuklären.

Mit Hilfe der so vorbereiteten Daten kann ein zusätzlicher Abgleich in der Datenbank (refSeq [NCBI]) gegen die genomische Nucleotidsequenz vom Menschen vorgenommen werden. So können mögliche Exon-Intron Grenzen im Genom ermittelt werden, da eine Unterbrechung in der Nukleotidsequenz der mRNA vorliegen kann. Da nicht für alle Transkripte auf der genomischen DNA ein Intron vorhanden ist, reicht die Sicherheit beim Assay-Design, einen spezifischen Primer oder eine Sonde auf eine Exon-Exon-Grenze zu legen, nicht aus. Um also Signale von genomischer DNA bei Transkripten ohne Intron zwischen zwei Exons ausschließen zu können, wird nach der Isolation der Gesamt-RNA ein Baseline-Zero-Schritt (siehe D.2.1 Behandlung der RNA mit Baseline-ZERO<sup>TM</sup> DNase) ausgeführt. Mit dieser Information werden Primer und Sonde für die Assays erstellt, indem diese benachbarten Exon-Exon-Grenzsequenzen als Indiz für den reversen Primer genutzt werden. Die Sequenz im Bereich dieser Exon-Exon-Grenze wird in das Primer 3 - Programm (siehe D.7.2 Primer 3) eingegeben. Bei dem Design der benötigten Primer und Sonden sollten folgende Bedingungen beachtet werden:

- Der Schmelzpunkt der Primer sollte bei 60°C(± 1°C) und der Schmelzpunkt der Sonde bei 67°C(± 3°C) liegen, so dass ein Temperaturunterschied zwischen Sonde und Primer von mindestens 3 K herrscht.

- Bei der Konstruktion der Sonde ist darauf zu achten, dass kein Guanin am 3'-Ende der Sonde liegt. Weiterhin soll der Anteil von Guanin und Cytosin am 3'-Ende der Sonde höher als am 5'-Ende sein und generell mehr Cytosin als Guanin beinhalten.
- Die Gesamtlänge des zu erzeugenden Amplifikats sollte für diese Betrachtungen bei ca. 90 bis 120 Basen liegen – möglichst aber unter 150 Basen.

## **D.2 RNA-Behandlung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle**

### **D.2.1 Behandlung der RNA mit Baseline-ZERO™ DNase**

Das Baseline Zero DNase Protokoll eignet sich besonders, wenn keine DNA in der Probe zurückbleiben darf.

Zu 25 µL der Probe in RNase-freiem Wasser werden 3 µL 10x Baseline-Zero DNase Reaction Buffer und 1µL Baseline-Zero DNase gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. In dem Reaktions-Puffer sind 100 mM Tris HCl (pH 7,5), 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM CaCl<sub>2</sub> enthalten, um optimale Reaktionsbedingungen zu erhalten.

Zum Abbruch kommen 3 µL Stopp-Puffer, der 30 mM EDTA enthält, in das Reaktionsgefäß, das für 10 min bei 65°C inkubiert wird. Bei diesem Schritt wird die Baseline-ZERO DNase inaktiviert. Damit die RNA bei 65°C nicht degradiert, ist unbedingt die Zugabe des EDTA mit einer Endkonzentration von 3 mM nötig.

### **D.2.2 RNA Clean-Up XS**

Mit Hilfe des RNA Clean-Up XS Kits von Macherey-Nagel wird die RNA über Filtersäulchen aufgereinigt, die eine spezielle Matrix beinhalten, welche RNA-Moleküle bestimmter Größe bindet und alle anderen Bestandteile der RNA-Lösung durchlässt. Mit einer 85 bis 95 % Rücklösungsrate wird am Ende die RNA mit RNase-freiem

Wasser von der Matrix gelöst und in einem separaten Sammelgefäß isoliert. Die so erhaltene RNA soll eine Reinheit bei einem Absorptionsverhältnis ( $A_{260}/A_{280}$ ) von mindestens 1,8 besitzen.

Laut Protokoll dieses Kits wird eine 1:1 Lösung mit dem RCU-Puffer hergestellt. Dann zwei Mal 5 s gut mixen (Vortexer) und bei 11.000x g 30 s zentrifugieren. Der erste Waschgang der an die Membran gebundenen RNA erfolgt mit 400 µL RA3-Puffer (enthält Ethanol) und wird für 30 s bei 11.000xg zentrifugiert. Es folgt ein zweiter Waschgang, bei dem erneut RA3-Puffer von 200 µl Volumen auf die Matrix gegeben wird und das Reaktionsgefäß 30 s bei 11.000x g zentrifugiert wird. Das Sammelgefäß wird anschließend entleert. Um die Membran restlos vom Waschpuffer zu befreien und zu trocknen, wird nun für 2 min bei 11.000xg zentrifugiert. Danach wird die Säule in ein neues RNase freies Sammelgefäß gestellt und mit 25 µL RNase-freiem Wasser die aufgereinigte RNA von der Matrix eluiert.

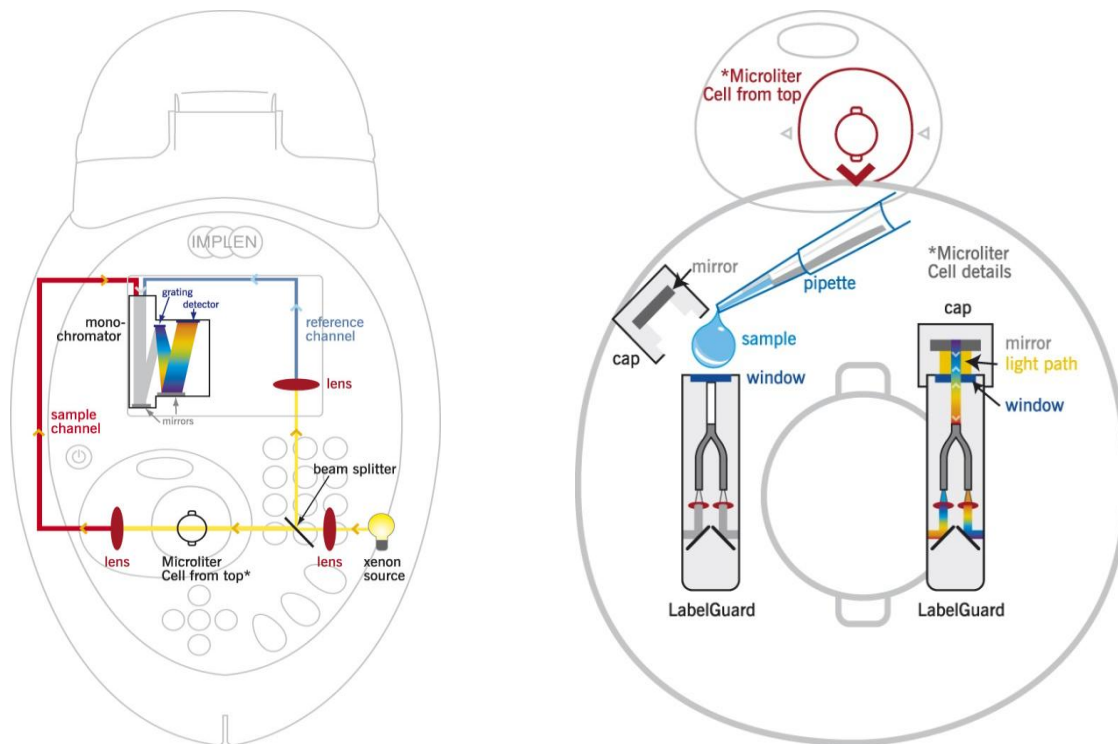
Zur Stabilisierung der Lösung (Schutz der RNA vor RNasen) wird Ribolock 1:10 verdünnt, je 1µl der Verdünnung zur RNA-Lösung hinzugegeben und die RNA-Lösung verteilt auf mehrere Gefäße (Aliquots) bei -80°C gelagert. Die Verteilung bezweckt den Schutz der RNA vor mehrfachem Auftauen und Einfrieren, was zu einer Degradierung der RNA auf Grund starker Belastung führen würde. So wird für jede Untersuchung nur die tatsächlich benötigte Menge an RNA verwendet.

### **D.2.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle von RNA und DNA mittels Absorptionsmessung**

Die Quantifizierung der RNA geschieht mittels Absorptionsmessung in einem Nanophotometer (siehe Abbildung 13: *Schematische Darstellung der Absorptionsmessung in einem Nanophotometer*). Um die Konzentration zu bestimmen, wird die Absorption der RNA bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Ein Wert von  $A_{260} = 1,0$  entspricht in etwa 33 µg/ml RNA. Typische Werte sollten sich zwischen 0,1 und 1,0 bewegen. Das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen von 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) dient als Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  sollte für eine reine RNA und DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt der



Quotient signifikant niedriger, ist die DNA/RNA wahrscheinlich mit Proteinen verunreinigt. Wenn der Quotient  $A_{260} / A_{230}$  bei RNA unter 2,0 liegt, dann ist die Probe mit genomischer DNA kontaminiert und eine DNase-Behandlung sollte durchgeführt werden. Eine erfolgreiche Behandlung zeigt sich durch einen Wert von 2,0 oder höher (Kartha, Trotier, Kreuz & Huber, 2007).



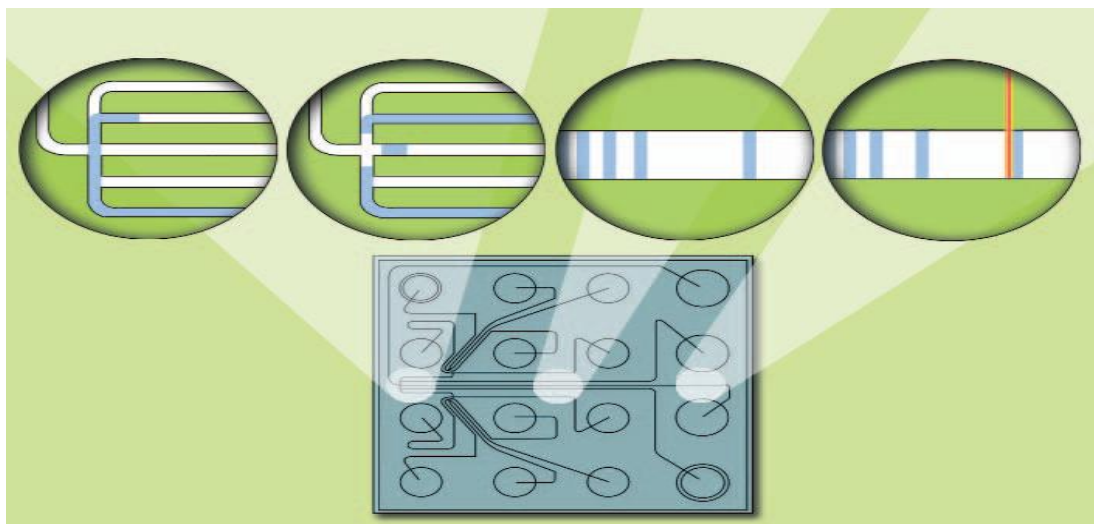
**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Absorptionsmessung in einem Nanophotometer (Quelle: <http://www.implen.de/img/nf3.jpg> und [http://www.implen.de/img/nano\\_funcnt\\_E.jpg](http://www.implen.de/img/nano_funcnt_E.jpg))

#### D.2.4 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA mit dem Small RNA Kit von Agilent Technologies

Das Agilent RNA Kit enthält Chips und Reagenzien die zur Analyse kleiner RNA-Fragmente entwickelt wurden. Jeder kleine RNA-Chip enthält einen Satz von Mikrokanälen, die miteinander verbunden sind. Dieses Set wird zur elektrophoretischen Trennung der Nukleinsäurefragmente nach Größe genutzt. Das

Agilent RNA-Kit wird zusammen mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Somit können Proben mit Gesamt-RNA oder kleinen Nukleinsäurefragmenten analysiert werden. Eine spezielle Software dient zur Darstellung und Auswertung der Ergebnisse in Form von Kurven und virtuellen Gelen. Die ribosomalen RNAs (18S- und 28S-rRNA) werden als Qualitätsreferenz für die Gesamt-RNA herangezogen, da diese in großen Mengen vorhanden sind. Wenn die zu untersuchende RNA intakt ist, erscheinen die 18S- und 28S-rRNA-Banden in der graphischen Darstellung als deutliche Peaks. Zusätzliche oder keine Peaks weisen auf eine Degradation oder Kontamination der RNA hin (Agilent Technologies, 2008).

Zuerst wird ein „Gelmix“ hergestellt, indem 550 µl der Nano-Gelmatrix auf einen Zentrifugen-Filter gegeben und bei 4.000 rpm für 10 min zentrifugiert wird. 65 µl von diesem Mix werden anschließend mit 1 µl Farbstoff versetzt und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wird der RNA-Chip zunächst mit dem angesetzten Mix und danach mit 5 µl des RNA Markers und 1 µl der jeweiligen Probe beladen (Agilent Technologies, 2008).



**Abbildung 14:** *Prinzip des RNA-Chips* (Quelle: Agilent Technologies, Agilent 2100 Bioanalyzer - Broschüre)

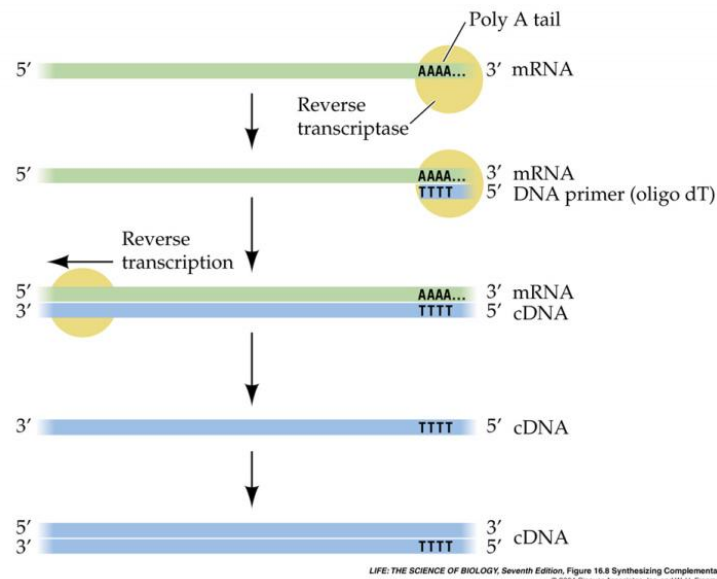
Zuerst wandert die Probe in die Mikrokanäle und wird später in einen Separationskanal injiziert, wo die einzelnen Komponenten elektrophoretisch getrennt werden. Diese werden anschließend durch ihre Fluoreszenz detektiert. Diese Fluoreszenzsignale werden wiederum in Gelbilder und Elektropherogramme umgewandelt.

## **D.3 Herstellung und Quantifizierung von cDNA**

### **D.3.1 Reverse Transkription**

Die Funktionen einer reversen Transkription ergibt sich bereits aus dem Namen. Demnach wird dabei eine RNA in eine DNA umgeschrieben und stellt somit die Umkehrung der Transkription dar.

Erstmals entdeckt wurde dieser Prozess 1970 bei Retroviren, denn hier liegt die Erbinformation nicht in Form von DNA, sondern in Form von RNA vor. Diese kann sowohl als Einzelstrang, wie auch als Doppelstrang bei Viren auftreten. Doch die Besonderheit der Retroviren beruht auf der Fähigkeit RNA in DNA umzuschreiben. Beim Eindringen in eine Wirtszelle ist genau dies der erste Schritt. Vom gesamten RNA-Genom des Retrovirus wird eine DNA-Kopie synthetisiert. Die DNA-Kopien werden in das Genom der Wirtszelle ligiert und führen unter Nutzung der natürlichen Prozesse der Genexpression der Wirtszelle zur Entstehung neuer Viren. Bis zum Jahr 1987 wurde diese Fähigkeit für ein einzelnes Phänomen gehalten, dass sich nur auf Retroviren beschränkt. Doch inzwischen weiß man, dass die reverse Transkription auch bei Hefe-, Insekten- und Säugetierzellen auftritt und das dafür verantwortliche Enzym wurde als reverse Transkriptase bzw. RNA-abhängige DNA-Polymerase bezeichnet (Varmus, 1987).



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung einer reversen Transkription mit Oligo(dT)-Primer (Quelle: <http://biology200.gsu.edu/houghton/4564%20%2704/figures/lecture%204/AAAreverse.jpg>)

Heute findet dieses Enzym tägliche Anwendung in der Molekularbiologie, aber v.a. bei der Analyse von Genexpressionen. Dabei wird aus Gewebeproben isolierte und aufgereinigte RNA mit Hilfe von gentechnisch verbesserter reverser Transkriptase in sogenannte "copy DNA" (cDNA) umgeschrieben. Dabei katalysiert die reverse Transkriptase nicht nur die reverse Transkription (Erststrang-Synthese, engl. First strand synthesis), sondern auch die Amplifikation der daraus hervorgehenden cDNA (Zweitstrang-Synthese, engl. Second strand synthesis). Dieser Prozess muss in einzelnen Schritten, jedoch dafür in nur einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. So wird zunächst mit Hilfe eines zur RNA komplementären Primers (z.B. Oligo(dT) oder Random Hexamers) und reverser Transkriptase nur der RNA/DNA-Hybrid synthetisiert (Erststrang-Synthese). Im nächsten Schritt wird RNase H, ein RNA-verdauendes Enzym, hinzugefügt sowie DNA-Polymerase I und ein zum cDNA-Strang komplementärer Primer. Dabei wird der RNA-Strang verdaut, der Primer bindet an die cDNA und synthetisiert den zweiten Strang. Anschließend kann die cDNA in einer PCR amplifiziert werden (siehe Abbildung 15: Schematische Darstellung einer reversen Transkription mit Oligo(dT)-Primer) (Kahl, 2009).

Der Grund für dieses Vorgehen liegt zum einen in der hohen Instabilität von RNA und zum anderen in der sehr häufig geringen Ausbeute der RNA-Isolation. RNA neigt meist zu einer sehr schnellen Degradierung unter starker Belastung (z.B. hohe Temperaturen, chemische Belastung) und Einwirkung von RNA-degradierenden Enzymen, die bereits bei geringsten Verunreinigungen auftreten können, da sie fast überall zu finden sind (v.a. auf der menschlichen Haut). Auch stabilisierende Enzym-Puffer (z.B. RiboLock) und Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  können RNA-Proben nur begrenzt vor einer Degradierung bewahren. Im Gegensatz dazu ist die Struktur der DNA bzw. eines RNA/DNA-Hybrids um einiges stabiler. Außerdem kann das umgeschriebene Transkript in dieser Form beliebig oft vervielfältigt werden und mit Restriktionsenzymen bearbeitet werden (siehe B.6 SuperSAGE-Technologie).

### **D.3.2 Das SuperScript III™ Doppelstrang cDNA Synthese-Kit von Invitrogen**

Das cDNA Synthesesystem stellt alle Materialien für eine schnelle und zuverlässige cDNA Synthese aus mRNA zur Verfügung. Es verwendet eine geklonte reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) um cDNA aus einer mRNA Population zu synthetisieren. Es erlaubt den zweiten Strang unmittelbar nach der Synthese des ersten Strangs zu synthetisieren. Dadurch steigt die Ausbeute an Doppelstrang-cDNA und Extraktions- und Präzipitationszwischen-schritte entfallen ganz. Die gewonnene Doppelstrang-cDNA kann entweder in ein Plasmid oder in einen Bakteriophagen-Vektor geklont werden.

Die Qualität der mRNA schreibt die maximale Menge an Sequenzinformationen vor, die während der Doppelstrang cDNA-Synthese erhalten bleibt. Die klassischen Bedingungen für die reverse RNA-Transkription stammen ganz aus der Arbeit mit der Avian Myeloblastosis Viral (AMV) reversen Transkriptase. Dieses Enzym wurde in großem Umfang genutzt und seine Reaktionsparameter sind gut dokumentiert, wodurch viele Verfahren für Zweitstrangsynthesen entwickelt wurden. Das erste Verfahren verlässt sich auf die Fähigkeit der AMV reversen Transkriptase, zufällig die Formation von sogenannten „Haarnadelschlingen“ (engl. hairpin-loops) am 3'-Ende

des cDNA-Einzelstrangs zu initiieren. Das RNA-Templat wird revers transkribiert und gleichzeitig durch die endogene RNase H - Aktivität der AMV reversen Transkriptase degradiert. So kann die entstandene Einzelstrang-cDNA durch Streckung ihre übliche Form annehmen, wodurch die Zweitstrangsynthese initiiert werden kann. Eine bedeutende Verbesserung des vorhergehenden Verfahrens ist das Okayama und Berg-Verfahren, welches auf der innovativen Methode der Primer-Generation für die Zweitstrangsynthese basiert. Die mRNA wird zum Primen der cDNA Synthese durch die *E. coli* DNA Polymerase I verwendet, nachdem diese durch die *E. coli* RNase H mit „Brüchen“ (gaps) versehen wurde. Okayama und Berg erweiterten diese Methode und entwarfen einen spezialisierten Klonierungsvektor aus zwei Teilen, um so viel Sequenzinformation wie möglich am 5'-Ende zu bewahren (Okayama & Berg, 1982).

Das Gubler und Hoffman-Verfahren macht es möglich, die klassische oligo(dT) geprimte Synthese des Erststrangs mit den Reaktionsbedingungen der Zweitstrangsynthese von Okayama und Berg miteinander zu kombinieren. Das cDNA-Synthesystem ist eine Modifikation des Gubler und Hoffman-Verfahrens und wurde so konzipiert, um die cDNA-Manipulation so gering wie möglich zu halten sowie die Länge und Ausbeute der Doppelstrang-cDNAs zu maximieren. Mit diesem Verfahren können 100 bis 20.000 ng Gesamt-RNA oder 5 bis 250 ng aufgereinigter Poly(A)-RNA in Einzelstrang-cDNA umgewandelt werden (Gubler & Hoffmann, 1983).

**Erststrangsynthese:** Zuerst wird die Poly(A)-RNA, in einem maximalem Volumen von 9 µl, mit 1 µl Oligo (dT) Primer (dT Olive, 100 µM) gemischt und bei 70°C für 10 min inkubiert. Anschließend wird die Probe für 5 min auf Eis gegeben, danach zentrifugiert und 4 µl 5x First-Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl RNase Out (40 U/µl) sowie 2 µl SuperScript III Reverse Transkriptase dazugegeben. Das Ganze wird nun homogenisiert, zentrifugiert und für 1 h bei 60°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe erneut auf Eis gegeben und sofort mit der Zweitstrangsynthese fortgefahren (Invitrogen, 2003).

**Zweitstrangsynthese:** Zu dem Reaktionsgemisch aus der Erststrangsynthese werden 91 µl DEPC ddH<sub>2</sub>O, 30 µl Second Strand Puffer, 3 µl 10 mM dNTP Mix, 4 µl

DNA Polymerase I (10 U/μl), 1 μl DNA Ligase (10 U/μl) und 1 μl RNase H (2 U/μl) dazugegeben. Nach Mischen der Komponenten wird die Probe für 2 h bei 16°C inkubiert und anschließend auf Eis gegeben (Invitrogen, 2003).

### **D.3.3 cDNA-Synthese mit dem Sprint™ RT Kit von Clontech**

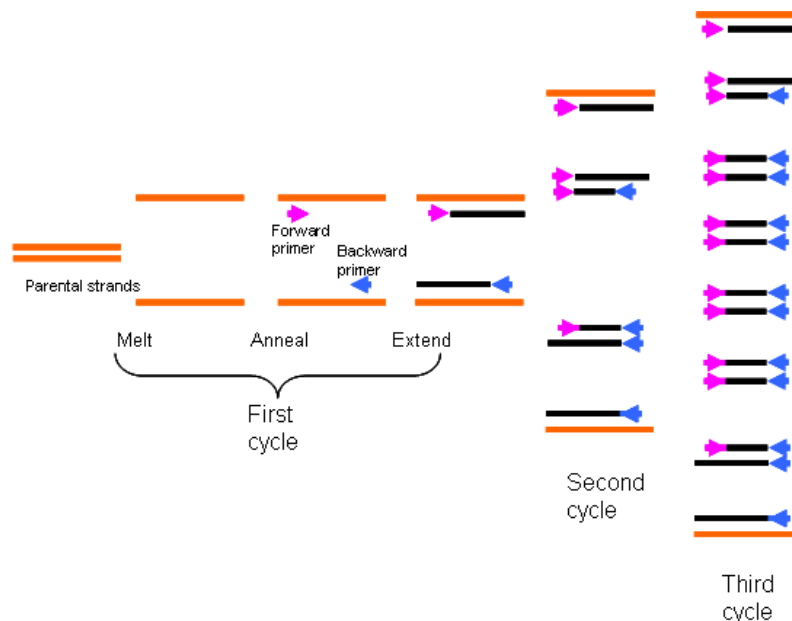
Das Sprint™ RT Kit von Clontech wurde so konzipiert, um aus 1 bis 5 μg Gesamt-RNA oder 50 ng bis 1 μg Poly(A)-mRNA Einzelstrang-cDNA zu synthetisieren. Die Vorteile dieses Kits sind zum einen, dass dieses mit seinen Komponenten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden kann und zum anderen, dass alle benötigten Reagenzien wie reverse Transkriptase, random Hexamere oder Oligo(dT)-Primer, MgCl<sub>2</sub>, BSA, DTT, dNTP-Mix, Reaktionspuffer, Cryoschutz und Stabilisatoren zusammen und pulverförmig in versiegelten transparenten PCR-Reaktionsröhrchen vorliegen.

Die RNA wird mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl gebracht, in das PCR Reaktionsröhrchen gegeben und mittels Pipettieren oder Mischen (Vortexen) mit den Reagenzien homogenisiert. Die Probe wird bei 42°C für 60 min und danach bei 70°C für 10 min inkubiert. Durch die letzte Inkubation wird die Reaktion beendet. Dies kann auch durch die Zugabe von 4 μl 60 mM EDTA erreicht werden (Clontech, 2009).

## **D.4 Polymerase–Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt. Diese eine Methode dient der Vervielfältigung kurzer, vorausbestimmbarer DNA-Fragmente mit Hilfe einer hitzestabilen Taq-Polymerase und einem Primer-Paar (forward und reverse Primer). Eine PCR besteht aus drei wesentlichen Schritten, die in einem vollautomatisierten Thermocycler in mehreren Zyklen wiederholt werden:

1. **Denaturierung (Schmelzen)** – die Doppelstrang-cDNA wird auf 96°C erhitzt, um die Nucleotid-Stränge zu trennen. Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden komplementären Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen.
2. **Primerhybridisierung (Annealing)** – Nach Trennung der Stränge wird die Temperatur auf 55°C bis 60°C gesenkt, so dass die Primer an die einzelnen DNA-Stränge binden können. Die exakte Temperatur dieses Schrittes ergibt sich aus der Länge und dem Anteil der einzelnen Basen an der Primer-Sequenz. Sie sollte 2 K unterhalb der Schmelztemperatur des jeweiligen Oligonucleotids liegen.
3. **Elongation (Verlängerung)** – Die DNA-Polymerase synthetisiert bei 72°C am 3'-Ende des angelagerten Primers den komplementären DNA-Strang.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion (Quelle: <http://www.obgynacademy.com/basicsciences/fetology/genetics/images/pcr.png>)



Das so entstandene PCR-Produkt ist ein Doppelstrang DNA-Fragment, das zur einen Hälfte aus dem alten Matrixstrang und zur anderen Hälfte aus einem neu synthetisierten, komplementären Strang besteht (semikonservative Replikation). Durch mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte erfolgt eine exponentielle Anreicherung des gewünschten Fragmentes (siehe Abbildung 16: Schematische Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion).

#### **D.4.1 SYBR® Green qRT-PCR**

Ziel war es, aus der gewonnenen cDNA bestimmte Sequenzen mittels quantitativer Real-Time-PCR im Lightcycler zu amplifizieren. Diese Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR), und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Generation der PCR Produkte wird durch Messung des SYBR® Green-Fluoreszenzsignals detektiert.

Zu Beginn der Amplifikation enthält der Reaktionsmix die denaturierte cDNA, Primer und den Farbstoff. Die ungebundenen Farbstoffmoleküle fluoreszieren nur schwach, produzieren aber trotzdem ein Fluoreszenzsignal, das während der Computeranalyse subtrahiert wird. Nach Anheften der Primer binden einige Farbstoffmoleküle an den cDNA-Doppelstrang. Durch diese Bindung an die cDNA steigt die Anzahl der lichtemittierenden und -stimulierten SYBR® Green-Moleküle. Während der Elongation binden immer mehr Farbstoffmoleküle an die synthetisierte cDNA. Wird die Reaktion kontinuierlich überwacht, so sieht man eine Zunahme der Fluoreszenz in Echtzeit. Nach Denaturierung der cDNA für den nächsten Heizzyklus lösen sich die Farbstoffmoleküle und das Fluoreszenzsignal nimmt wieder ab. Die Fluoreszenzmessung wird am Ende des Verlängerungsschritts nach jedem PCR Zyklus durchgeführt, um die Menge an amplifizierter DNA zu verfolgen.

Schmelzkurvenanalyse:

Um zu beweisen dass nur das gewünschte PCR Produkt amplifiziert wurde, wird anschließend eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Bei dieser Analyse wird das Reaktionsgemisch langsam auf 95°C erhitzt, wodurch die Doppelstrang-cDNA schmilzt und die Fluoreszenz abnimmt. Das Instrument verfolgt diese Abnahme kontinuierlich und zeigt diese als Schmelzkurve an. Jeder Peak dieser Kurve repräsentiert die charakteristische Schmelztemperatur eines partikulären PCR Produkts. Eine typische Schmelzkurve sollte nur einen Peak zeigen. Mehrere Peaks deuten auf Verunreinigungen oder zusätzliche PCR-Produkte hin. Zusätzlich kann eine Gel-Elektrophorese vorgenommen werden, um bestimmte PCR-Produkte sowie eventuelle Nebenprodukte zu visualisieren.

Reaktionsgemisch je Probe:

cDNA	2 µl (5-10 ng)
forward Primer	0,15 µl (10 µM)
reverse Primer	0,15 µl (10 µM)
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	5,2 µl
2x SYBR® MasterMix	7,5 µl

-----

Gesamtvolumen:	15 µl
----------------	-------

Thermocycler Programm:

96°C für 10 min

(95°C für 15 s; 60°C für 1 min) 40x

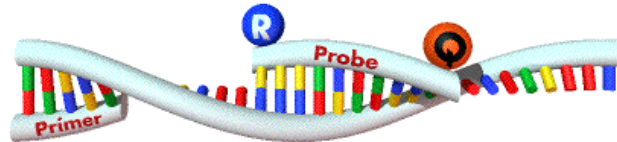
(95°C für 15 s; 60°C für 1 min) Schmelzkurve

#### D.4.2 TaqMan™ qRT-PCR

Diese schnelle und sehr sensitive PCR-Methode wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt und basiert auf einer spezifischen primer-definierten enzymatischen in vitro DNA-Replikation, bei der durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Der Nachweis der entstehenden PCR-Produkte erfordert jedoch meist einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand. So bestehen z.B. Southern-, Dot- und Reverse-Dot-Blotting aus mehreren Fixierungs- und Waschschritten. Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen, war man deshalb schnell bemüht, ein sogenanntes homogenes "Assay" zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß ermöglicht werden. Dies gelang erstmals 1991 mit dem von Holland et al. beschriebenen 5'-Exonuclease-PCR-Assay unter Ausnutzung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Detektion der sequenz-spezifischen Amplifikation. Allerdings erforderte diese Technik ein aufwendiges Post-PCR-Processing. So wurden P-32-markierte Sonden verwendet und Sondenfragmente von intakten Sonden mittels Dünnschichtchromatographie im Anschluss an die Reaktion unterschieden. Erst mit den von Lee et al. 1993 bei Applied Biosystems entwickelten fluorogenen Sonden wurde es möglich, den Abbau der Sonde ohne aufwendige Post-PCR-Schritte zu detektieren. Dieses sogenannte "TaqMan™ PCR Assay" basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuclease-Assay und macht sich zunächst ebenfalls die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze (siehe Abbildung 17: *Einfluss der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan™ PCR*). Hierfür wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist (Schild, 1998).

Anhand folgender Abbildungen soll das Verfahren näher erläutert werden:

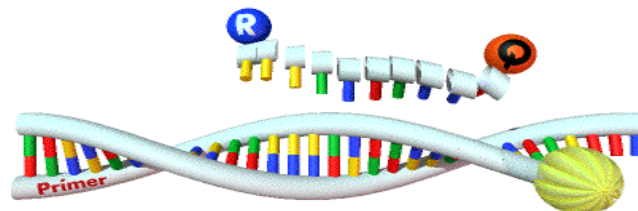
1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers)



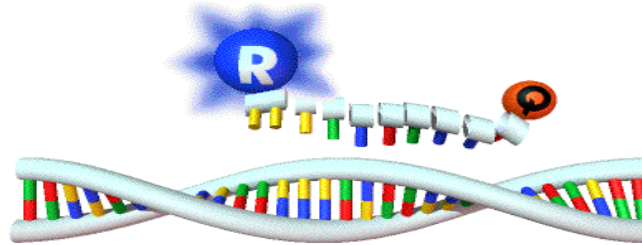
2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt



4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reportermoleküle wächst das Reporter-Signal



**Abbildung 17:** Einfluss der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase auf eine fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan<sup>TM</sup> PCR (Quelle: Schild, 1998)

Zeichenerklärung: TaqMan<sup>TM</sup>-Gensonde (engl. Probe), Reporter (R), Quencher (Q)

Während der kompletten Reaktionszeit wird der PCR-Ansatz mittels eines Lasers bei einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt. Im intakten Zustand der Sonde befinden sich Reporter und Quencher räumlich so dicht beieinander, dass der Quencher fast die komplette Anregungsenergie des Reporters aufnimmt und in einer höheren Wellenlänge wieder abstrahlt. Dieser Vorgang des Fluoreszenz-Energietransfers (FET) verhindert also, dass bei entsprechender Wellenlänge ein Fluoreszenz-Signal registriert werden kann. In Schritt zwei beginnt die Taq-Polymerase mit dem Aufbau des komplementären Stranges. Wird dabei die Sonde erreicht, wird diese aufgrund der 5'-3'-Exonuklease- Aktivität der Polymerase hydrolysiert. Im weiteren Verlauf wird die Sonde vollständig fragmentiert, während gleichzeitig das PCR-Produkt synthetisiert wird. Reporter und Quencher sind somit nicht mehr miteinander verbunden und entfernen sich räumlich voneinander. Daraus resultiert ein ansteigendes Reporter-Fluoreszenz-Signal, da der Energietransfer zum Quencher durch die räumliche Entfernung aufgehoben wird. Dabei ist die Fluoreszenz proportional zum entstehenden PCR-Produkt (Schild, 1998).

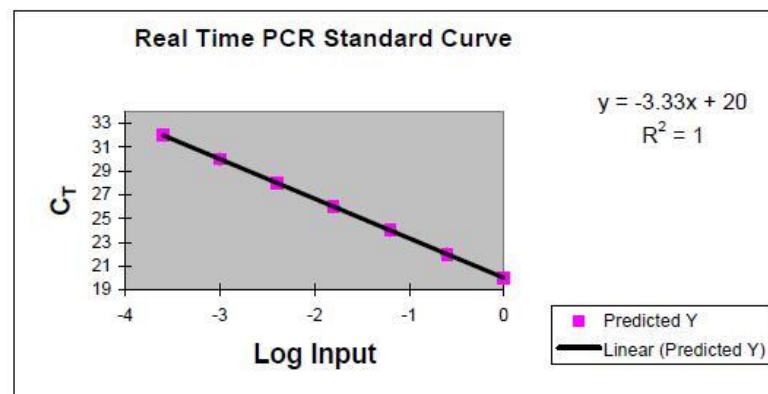
Man unterscheidet zwischen einer „TwoStep qPCR“, bei der Einzelstrang- oder Doppelstrang-cDNA als Templat dient, und einer „OneStep-qPCR“, bei der Gesamt-

RNA als Templat dient. Bei der OneStep-qPCR wird nur das Ziel-Gen in einem RT-Schritt vor der qPCR umgeschrieben. Vorteil ist hier vor allem, dass man in einem Reaktionsansatz sowohl cDNA-Synthese und qPCR durchföhrt. Wegen der Reduktion von Pipettier-Fehlern ist diese Methode vor allem bei Nachweisen von niedrig abundanten Transkripten vorzuziehen.

### D.4.3 Interpretation der TaqMan-Ergebnisse

Prinzipiell unterscheidet man zwei grundlegende Quantifizierungsstrategien:

Bei der **absoluten Quantifizierung** wird mittels einer Standardkurve eine unbekannte Probe durch Interpolation der Werte quantifiziert.



**Abbildung 18:** Standard-Kurve einer Real-Time PCR (Quelle: Handbuch StepOne AppliedBiosystems)

Die **relative Quantifizierung** ist eine vergleichende  $C_T$ -Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode) zur Quantifizierung der Genexpression. Dabei werden die Expressionsstufen einer abweichenden Probe mit einer Referenz (Kontrolle) verglichen. Als Referenz dient meist eine bestimmte Probe, die als Standard definiert wird (Normalzustand des Gewebes). Auf diese Weise kann man die Expression verschiedener Gene relativ zueinander abschätzen. Bei der Messung durch das StepOne-System wird während der gesamten PCR das Fluoreszenzsignal der umgesetzten Sonden in den einzelnen

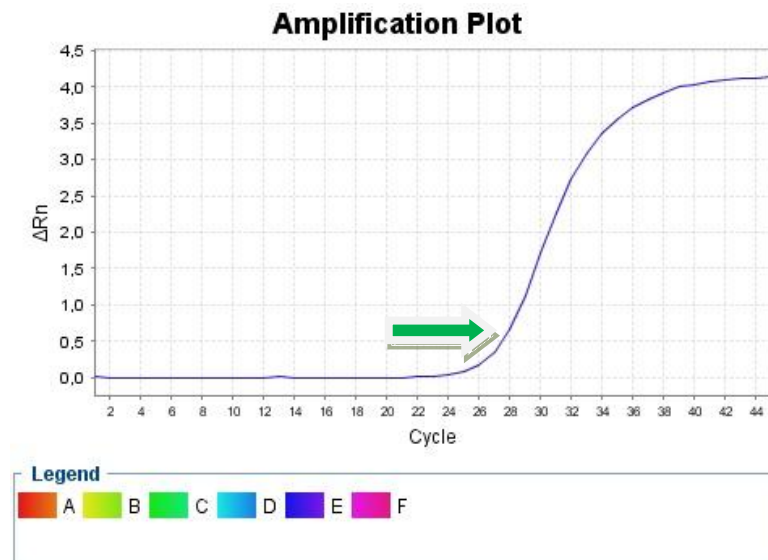
Reaktionsansätzen gemessen (bis zu 48 Ansätze). Ab einem bestimmten Punkt der PCR, steigt das Fluoreszenzsignal exponentiell an, was bedeutet, dass ab diesem Zeitpunkt die Amplifizierung der DNA ebenfalls exponentiell erfolgt. Das System erfasst dabei die Anzahl der Zyklen, die der Reaktionsansatz bis zu diesem Zeitpunkt benötigt. Dieser Wert wird als Schwellenwert (engl. CycleTreshhold,  $C_T$ ) bezeichnet. Er weicht bei unterschiedlichen Transkripten bzw. Zielsequenzen der Sonden voneinander ab. Der Treshhold ist direkt proportional zur Anzahl der Kopien eines bestimmten Transkriptes vor Beginn der PCR, d.h. er ist direkt proportional zur Genexpression. Die Werte werden durch konstitutive- oder Haushalts-Gene (eng. „housekeeping genes“) normalisiert. Die Genexpression dieser Transkripte wird auf die gleiche Weise wie die Zielsequenzen in den RNA- bzw. cDNA-Proben erfasst und ist unabhängig von allen Umwelteinflüssen konstant. Mit Hilfe zweier Differenzen des Schwellenwertes ( $\Delta C_T$ ) wird der Fold-Change R berechnet:

- $\Delta C_{T,S}$  basiert auf den  $C_T$ -Werten der Zielsequenz und des Haushaltsgens
- $\Delta C_{T,R}$  basiert auf den  $C_T$ -Werten der Referenz und des Haushaltsgens

Aus diesen beiden  $\Delta C_T$ -Werten wird eine weitere Differenz der  $\Delta \Delta C_T$ -Wert berechnet. Der Fold-Change R beschreibt das Verhältnis der Genexpression zwischen Zielsequenz und Kontrolle und berechnet sich nun, wie folgt:

$$R = 2^{-(\Delta C_{T,S} - \Delta C_{T,R})} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Auf ähnliche Art und Weise kann ebenso ein Wert aus den SuperSAGE-Daten berechnet und mit diesem hier verglichen werden. Weichen die beiden Werte nur geringfügig voneinander ab bzw. sind gleich, so werden die SuperSAGE-Daten damit bestätigt.



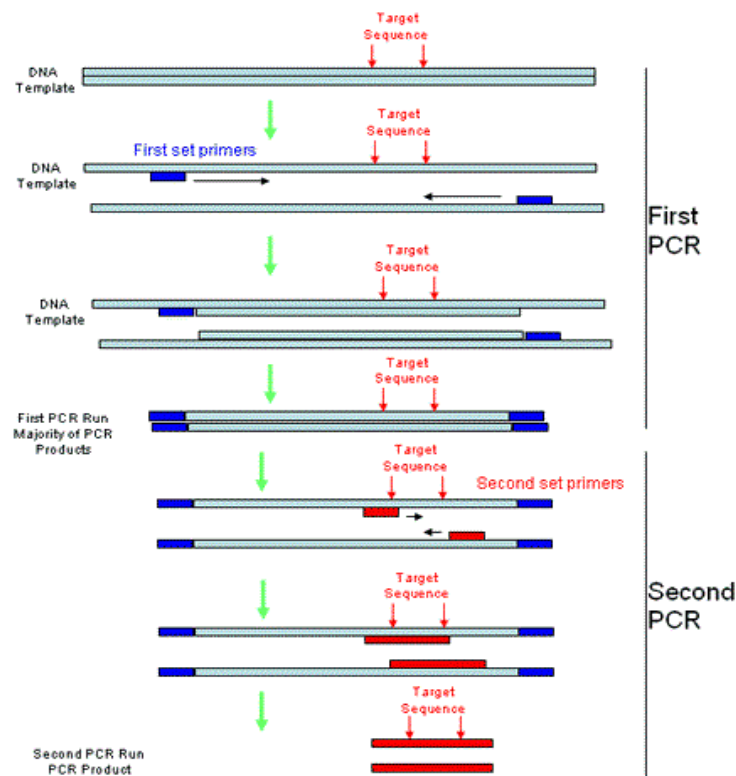
**Abbildung 19:** Amplifikations-Plot erstellt mit der StepOne Software. Der Pfeil zeigt den Bereich der exponentiellen Phase der PCR, in dem der Cycle threshold (Ct-Wert) gemessen wird (hier ein Ct von 28)

In Abbildung 19 wird eine gemessene Reaktion in linearer Abhängigkeit dargestellt. Auf der Abszisse werden die normalisierten Emissionswerte der FAM-Fluoreszenz gegen die ROX-Fluoreszenz (passive Referenz) dividiert aufgetragen. Die so ermittelten Werte werden mit  $\Delta R_n$  bezeichnet. Bei jedem durchlaufenen Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen und auf der Ordinate aufgetragen. Ist die entstehende Kurve sigmoid und relativ hoch, so kann eine einfache Auswertung erfolgen. Der Cycle threshold (Ct-Wert) muss in der vertikalen Region der Kurve und damit in der exponentiellen Phase der PCR liegen (siehe Abbildung 19: Amplifikations-Plot). Anhand dieser erzeugten Werte kann die Auswertung mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode und Fold change-Berechnung (relative Quantifizierung) erfolgen (Pfaffl, 2001).



#### D.4.4 Nested PCR

Die sogenannte "nested PCR" (dt. verschachtelte PCR) ist eine modifizierte Form der allgemeinen PCR, mit dem Ziel die Kontaminationen im PCR-Produkt zu reduzieren, die durch die unspezifische Bindung der Primer in unerwarteten Bereichen der DNA-Sequenz auftreten können. Bei einer "nested PCR" verwendet man zwei verschiedene Primer-Paare, die in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Durchläufen verwendet werden. Dabei amplifiziert das zweite Paar einen Sequenzabschnitt innerhalb des Produktes der ersten PCR.



**Abbildung 20:** Schematische Darstellung einer Nested PCR (Quelle: <http://www.pcrstation.com/images/nested-pcr.gif>)

#### D.4.5 Strang-spezifische qRT-PCR

Um gezielt ein Antisense-Transkript nachzuweisen und zu quantifizieren, muss man zunächst die aRNA aus der Gesamt-RNA einer Probe isolieren. Dazu wurde ein Protokoll (siehe H. ANHANG) entwickelt, dass sich nach einem Verfahren von Lanford et al. (1994) richtet. Dafür wird ein sequenzspezifischer Primer entworfen, dem eine zusätzliche unspezifische Nucleotid-Sequenz (Tag) am 5'-Ende angehängt wird. Bei der Erststrangsynthese bindet der spezifische Teil des „tagged Primers“ an die aRNA, während der angehängte Tag einen ungebundenen 5'-Überhang bildet. Die reverse Transkriptase synthetisiert einen komplementären Gegenstrang zur aRNA. Darauf erfolgt eine Behandlung mit Exonuclease I (E.coli), die sämtliche einzelsträngigen Nucleotide verdaut. Der Zweck dieses Verdau ist in erster Linie die Beseitigung sämtlicher Primer, da die Möglichkeit besteht, dass bei der anschließenden Aufreinigung mit dem „QIAGEN PCR Purification Kit“ die tagged Primer auf Grund ihrer Größe nicht ausgewaschen und somit bei der Zweitstrangsynthese ebenfalls amplifiziert würden.

Bei der Zweitstrangsynthese gibt es nun zwei mögliche Ansätze. Der erste Ansatz ist eine exponentielle Amplifikation (PCR), bei der im ersten Zyklus der Gegenstrang der zuvor synthetisierten Einzelstrang-cDNA synthetisiert und in den anschließenden PCR-Zyklen der entstandene Doppelstrang vervielfältigt wird. Am besten geeignet sind dafür sogenannte „random Primer“ (z.B. random hexamers), die an jede Sequenz binden können. Der zweite Ansatz ist eine lineare Amplifikation, bei der lediglich der Gegenstrang synthetisiert wird. Hierfür muss ein strang-spezifischer Primer verwendet werden, der nur an die Einzelstrang-cDNA bindet. Der Vorteil des zweiten Ansatzes besteht darin, dass das Verhältnis der Anzahl der einzelnen Transkripte zueinander erhalten bleibt. Um in einer PCR das Verhältnis aufrechtzuerhalten, muss die Effizienz der Amplifikation immer gleich bleiben, was nur durch spezifische Primer, die immer das gleiche Produkt (konstante Länge) liefern, umgesetzt werden kann.

In der anschließenden qPCR wird die synthetisierte cDNA als Templat und die angehängte Tag-Sequenz als forward Primer verwendet. Als reverse Primer dient ein strangspezifisches Oligonukleotid, dass zuvor mit Hilfe von Primer 3 erstellt wurde.

Die so erhobenen Expressions-Werte sollten sich somit ausschließlich auf Antisense-Transkripte beziehen.

## **D.5 Klonieren von PCR-Produkten**

### **D.5.1 Prinzip des Blau-Weiß-Screenings**

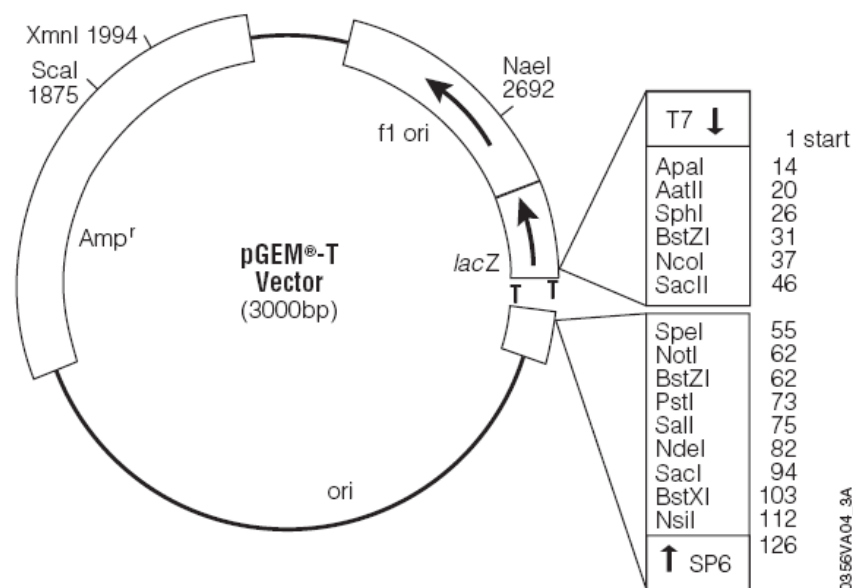
Das Verfahren des Blau-Weiß-Screenings ermöglicht es, rekombinante *E. coli* Klone (kompetente Zellen des Stammes JM109, Promega) von nicht rekombinanten Klonen zu unterscheiden. Dazu ist die Verwendung eines geeigneten Selektionsmarkers notwendig. Der eingesetzte Vektor (pGEM®-T, Promega) enthält ein Ampicillin-Resistenzgen sowie ein Gen für die Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase (*lacZ*). Durch das vorhandene Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin können auch nur solche Zellen auf einem mit Ampicillin, X-Gal und IPTG angereicherten Nährmedium wachsen, bei denen die Transformation erfolgreich war.

Mit einem zweiten Selektionsschritt können nun die kompetenten *E. coli*-Zellen, die einen Vektor mit Insert aufgenommen haben und transformiert wurden, von denen, die einen Vektor ohne Insert aufgenommen haben, unterschieden werden. Dabei wird von der Kenntnis Gebrauch gemacht, dass IPTG die Bildung von  $\beta$ -Galactosidase induziert, welches das Substrat X-Gal spaltet. Das dabei entstehende Spaltprodukt hat die Eigenschaft, dass es sich bei Anwesenheit von Sauerstoff durch Reaktion blau verfärbt. Nur wenn der Vektor kein Insert aufgenommen hat und somit das Leseraster nicht unterbrochen ist, kann dieser Mechanismus so ablaufen. Das zu klonierende Fragment wird innerhalb der Sequenz des *lacZ*-Gens in den Vektor eingefügt. Ist die Transformation erfolgreich, so wird kein Enzym gebildet und X-Gal kann nicht gespalten werden, wodurch diese Kolonien weiß bleiben.

### D.5.2 Ligation von DNA in einen Vektor

Mit dem pGEM®-T Vektorsystem von Promega wurde die Ligation der PCR-Amplifikate (cDNA-Synthese-Produkte) in den Vektor durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine T/A-Ligation, welche die Tatsache ausnutzt, dass bei der PCR die DNA-Polymerase während der Elongationsphase an jedes entstandene Fragment einen A-Überhang anbringt. Da der verwendete pGEM®-T Vektor in der MCS (engl. Multiple Cloning Site) über einen komplementären T-Überhang und die PCR-Produkte über einen A-Überhang verfügen, wird die Ligation durch die „klebrigen Enden“ (Engl.: Sticky-Ends) sehr effektiv.

Je Probe werden hierfür 5 µl 2x Rapid-Ligation-Puffer, 1 µl pGEM®-T Vektor, 3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt und 1 µl T4 DNA-Ligase miteinander vermengt und über Nacht bei 4°C inkubiert.



**Abbildung 21:** Darstellung des pGEM®-T Vektors mit Sequenzreferenzpunkten (Quelle: Promega Corporation, 2007)

### D.5.3 Transformation von kompetenten Zellen

Die Transformation der kompetenten *E.coli* Zellen (JM109, Promega) durch Aufnahme des pGEM®-T Vektors erfolgt durch einen Hitzeschock. Zunächst werden 2 µl des Ligationsansatzes aus Abschnitt D.5.2 mit 40 µl Zellsuspension aus kompetenten Zellen in ein PCR-Tube pipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Tube für 45 s in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben und danach sofort wieder für 2 min auf Eis überführt. Nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium (bei Raumtemperatur) wird der Ansatz bei 37°C für 1,5 h inkubiert. Zuletzt werden jeweils 100 µl, 200 µl und der Rest des Ansatzes auf LB-Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wo das Wachstum der Kolonien erfolgt.

### D.5.4 Colony-PCR

Die bei 37°C über Nacht im Brutschrank gewachsenen, weißen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 45 µl 0,2x TE-Puffer überführt, und bei 96°C für 3 min denaturiert. Der Überstand wird nach kurzer Zentrifugation als Templat für die Colony-PCR eingesetzt. Die eingesetzten Oligonucleotid-Primer, M13 forward und reverse, sind komplementär zu bestimmten Abschnitten in der MCS des Vektors. Dadurch flankieren sie die Insert-Region des Vektors, die durch die Colony-PCR amplifiziert wurde. Die so erhaltenen PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, verifiziert und mit dem SureClean-Verfahren von Bioline aufgereinigt.

## D.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt werden. Die Auftrennung erfolgt durch Anlegen einer Spannung von ca. 120 V an eine Gelkammer, in der sich das Agarosegel und 0,5x TBE-Puffer (Lauf-Puffer) befinden. Nach Auftragen der einzelnen Proben in die jeweiligen Geltaschen wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung der Anode. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Fragmentgröße, der angelegten Spannung und der Agarosekonzentration ab. Die in dieser Arbeit verwendeten Gele wurden in einer Konzentration von 1,5 Mas% Agarose in 0,5x TBE-Puffer angesetzt. Ziel war es im Bereich von 100 bis 1.000 bp eine gute Auflösung zu erhalten (Mülhardt, 2006). Neben den Proben mit den unbekannten Fragmenten wurde ein Marker (LadderMix, 50 ng/μl), bestehend aus einer Mischung aus Fragmenten bekannter Größe, mit auf das Gel aufgetragen. Vergleicht man nun die Wanderungsstrecken der Fragmente des Markers mit denen der einzelnen Proben, so kann man deren Größe näherungsweise bestimmen. Nach etwa 30 bis 40 min wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und für 15 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gegeben. Danach kam das Gel für weitere 15 min in ein VE (vollentsalztes) Wasser-Entfärbebad, um anschließend in eine UV-Lichtkammer gegeben zu werden. Dort wurden die Fragmentbanden des Gels mit UV-Licht sichtbar gemacht und für spätere Analysen und Dokumentationen fotografiert. Das entstandene Bandenmuster konnte nun ausgewertet und die Fragmentgrößen der aufgetragenen Proben mit Hilfe des Markers, welcher parallel im Gel neben dem Proben mitlief, ermittelt werden.

## **D.7 Verwendete Computerprogramme**

### **D.7.1 BioEdit**

BioEdit ist ein Programm zur Analyse und Anordnung von Nukleotidsequenzen oder Aminosäuresequenzen. Mit diesem Programm können verschiedene Sequenzen miteinander verglichen und Abweichungen dargestellt werden. Die so ausgerichteten Nukleotidsequenzen können mit anderen Datenbanken abgeglichen werden. Ebenfalls können dadurch verschiedene Sequenzen des gleichen Gens auf Isoformen untersucht werden. Zusätzlich lässt sich durch dieses Programm eine Tabelle erstellen, die die in der Sequenz enthaltenen Restriktionsschnittstellen anzeigt.

### **D.7.2 Primer 3**

Dieses Programm unterstützt das Entwerfen von PCR Primern mit den gewünschten Parametern. Außerdem kann eine Hybridisierungssonde designet werden.

### **D.7.3 BLAST-Programme**

Der am Weitesten verbreitete Suchalgorithmus ist in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) integriert und wurde 1990 von Stephen F. Altschul zunächst für einen Vergleich von Proteinsequenzen publiziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Mit Hilfe dieses Programms können charakteristische Aussagen über die unbekannten Sequenzen im Vergleich zu bereits Bekannten getroffen werden. Die Sequenzähnlichkeit kann eine Auskunft über die Gen- bzw. Proteinfunktionen geben. Außerdem kann die Datenbank, gegen die abgeglichen werden soll, nach verschiedenen Organismen ausgewählt werden. Die BLAST-Funktion „blastn“ dient zur Detektion von Homologien zu bereits bekannten und hinterlegten

Nukleinsäuresequenzen. Mit der BLAST-Funktion „tblastx“ können Proteindatenbanken auf Homologien abgeglichen werden.

#### **D.7.4 StepOne Software**

Diese Software dient der Programmierung der qRT-PCR und der Entwicklung des Platten-Layouts. Außerdem können die gemessenen Werte grafisch dargestellt und in Echtzeit verfolgt werden. Dabei kann man zwischen verschiedenen Ansichten und Darstellungsformen wechseln. Im Anschluss an einen Durchlauf können die gewonnenen Daten zu Excel und die Grafiken zu Power Point exportiert und ausgewertet werden.

#### **D.7.5 Digi-Print® Control Software**

Diese Software ermöglicht es mit einem digitalen Fotoapparat aufgenommene Agarosegele als Bilddateien zu bearbeiten, um somit deren Qualität zu verbessern. So können z.B. undeutliche oder schwache Bereiche eines Bildes durch Lichtfilter sichtbar gemacht werden.



## E. ERGEBNISSE

### E.1 Isolation, Identifikation und Quantifizierung von Antisense-RNA

#### E.1.1 Auswahl von Kandidaten für qPCR

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, wurden basierend auf der SuperSAGE-Datenbank geeignete Antisense-Transkripte aus einer Gesamtliste von beinahe 190.000 Transkripten, von denen ca. 13.000 Antisense-Transkripte sind, für die nähere Analyse mittels qPCR ausgewählt und entsprechende Primer und Sonden mit Hilfe von Primer 3 entworfen.

Der erste Kandidat zum Test verschiedener Verfahren zur Isolation einer Antisense-RNA bzw. der Umschreibung in eine Antisense-cDNA ist COL1A2 (Collagen, Typ I, Alpha 2). Dieses Transkript kodiert für eines der Proteine, die Bestandteil des Kollagens sind, wie es in jedem Bindegewebe zu finden ist. Laut SuperSAGE-Daten ist der Expressions-Level dieses Transkriptes in Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe und chronischer Pankreatitis stark erhöht. Es wurden insgesamt zwei forward und drei reverse Primer sowie zwei fluoreszenz-markierte Sonden (FAM) in der Nähe des SuperTags dieses Transkriptes erstellt, was drei Kombinationsmöglichkeiten (jeweils fwd + rev + Sonde) für die cDNA Synthese ergibt (siehe Abbildung 22: *Primer und Sonden für ein Antisense-qPCR-Assay am Beispiel von COL1A2*).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden Assays für 20 weitere Antisense-Transkripte entworfen und eine entsprechende strangspezifische cDNA hergestellt. Einen Auszug dieser Transkripte mit den zugehörigen normalisierten Ergebnissen der SuperSAGE Analyse ist in der Tabelle 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2:** Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse einiger aRNA-Kandidaten für die qPCR (nml = normalisiert; Anzahl SuperTags pro 1 Mio. Transkripte)

ID	Description	Donor-nml	CP-nml	IPMT-nml	Tumor-nml
Panc-RPS8	Homo sapiens ribosomal protein S8, mRNA	145.02	197.54	147.23	188.55
Panc-RPL34	Homo sapiens ribosomal protein L34, mRNA	34.45	113.62	61.07	24.66
Panc-RUNX1	Homo sapiens runt-related transcription factor 1, transcript variant 1, mRNA	0.39	0.48	6.07	6.78
>Panc-4083	Homo sapiens forkhead box P1, transcript variant 1, mRNA	0.39	0.24	1.14	1.69
>Panc-46684	Homo sapiens histone deacetylase 2, mRNA	0.39	3.57	4.55	4.24
>Panc-9942	Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 2, transcript variant 1, mRNA	0.39	0.24	0.76	3.11
>Panc-18971	Homo sapiens forkhead box A1, mRNA	0.50	0.48	0.76	1.69
Panc-EGR1	Homo sapiens early growth response 1, mRNA	6.01	89.86	330.81	129.21
>Panc-62107	Homo sapiens mal, T-cell differentiation protein-like, mRNA	0.50	1.66	1.14	13.84
>Panc-36531	Homo sapiens forkhead box P1, transcript variant 1, mRNA	0.77	2.38	2.66	3.11
Panc-RPS29	Homo sapiens ribosomal protein S29, mRNA	18.03	83.15	47.26	31.60
>Panc-54245	Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor 1, transcript variant 1, mRNA	0.77	0.50	1.90	6.21
>Panc-43355	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, beta, mRNA	2.58	0.26	2.00	0.73
>Panc-62907	Homo sapiens forkhead box P1, transcript variant 1, mRNA	1.54	6.42	3.79	4.24
>Panc-12087	Homo sapiens interferon regulatory factor 2, mRNA	1.93	2.85	4.55	6.49
>Panc-2202	Homo sapiens RAP2B, member of RAS oncogene family, mRNA	1.93	1.43	6.45	11.01
>Panc-37649	Homo sapiens MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor), transcript variant1/variant 2, mRNA	1.93	5.95	1.14	7.34
>Panc-64470	Homo sapiens salt-inducible kinase 1 (SIK1), mRNA	3.47	6.90	27.69	31.63
Panc-TMED2	Homo sapiens transmembrane emp24 domain trafficking protein 2 (TMED2), mRNA	58.89	63.01	78.16	103.52
>Panc-30121	Homo sapiens connective tissue growth factor, mRNA	6.94	17.36	30.73	30.50

Unspecific Tag (fwd) **GGCCGTCATGGTGGCGAATAA**

Panc-COL1A2-RTa **GGCCGTCATGGTGGCGAATAA**GATGGCTGCTCTAAAAAGACAAA

Panc-COL1A2-reva **GGTCAGCACCACCGATGT**

Panc-COL1A2-TMa **ATACAAAACAAAATAAGCCATCACGCCTG**

>gi|48762933|ref|NM\_000089.3| Homo sapiens collagen, type I, alpha 2 (COL1A2), mRNA

**GGCCGTCATGGTGGCGAATAA**  
 TGTGAACTTGTGCTGAGGGCAACAGCAGGTTCACTTACACTGTTCTTGTAGATGGCTGCTCT|AAAAAGA  
 CAAA|TGAATGGGGAAAGACAATCATTGA**ATACAAAACAAAATAAGCCATCACGCCTG**CCCTTCCTTGATATTG  
 CACCTTTGG**ACATCGGTGGTGTGCTGACC**AGGAATTCTTTGTGGACATTGGCCCAGTCTGTTTCAAATAAATGA  
 ACTCAATCTAAATTAAAAAGAAAGAAATTTGAAAAAATTTCTCTTTGCCATTTCTTCTTTCTTTT  
 ACTGAAAGCTGAATCCTTCCATTTCTTCTGCACATCTACTTGCTTAAATTGTGGGCAAAAGAGAAAAAGAA  
 GATTGATCAGAGCATTGTGAATACAGTTTCATTAACTCCTTCCCCCGCTCCCCAAAAATTTGAATTTTTT  
 TTTCAACACTCTTACACCTGTTATGGAAAATGTCAACCTTTGTAAGAAAACCAAATAAAAAATTGAAAAATA  
 AAAACCATAAACATTTGCACCACTTGTGGCTTTTGAATATCTTCCACAGAGGGAAGTTTAAACCCAACTT  
 CCAAAGGTTTAACTACCTCAAAACACTTTCCCATGAGTGTGATCCACATTGTTAGGTGCTGACCTAGACAG  
 AGATGAACTGAGGTCCTTGTGTTTGTGTTTGTTCATAATACAAAGGTGCTAATTAATAGTATTTAGATACTTG  
 AAGAATGTTGATGGTGCTAGAAGAATTTGAGAAGAAATACTCCTGTATTGAGTTGTATCGTGTGGTGTATTT  
 TTTAAAAAATTTGATTTAGCATTATATTTCCATCTTATTCCCAATTAAGATATGCAGATTATTTGCCCA  
 AATCTTCTTCAGATTTCAGCATTGTGTTCTTGG**CAGTCTCATTTTTCATCTTCTTCCATG**GTTCCACAGAAGCT  
 TTGTTTCTTGGGCAAGCAGAAAAATTAAATTGTACCTATTTTGTATATGTGAGATGTTTAAATAAATTGTGA

Product Size: 119

Unspecific Tag (fwd) **GGCCGTCATGGTGGCGAATAA**

Panc-COL1A2-RTb **GGCCGTCATGGTGGCGAATAA**CAGTCTCATTTTTCATCTTCTTCCA

Panc-COL1A2-revb **AAAACCAAACATGCTTTATTTTCATT**

Panc-COL1A2-TMb **CTTTGTTTCTTGGGCAAGCAGAAAAATT**

**GGCCGTCATGGTGGCGAATAA**CAGTCTCATTTTTCATCTTCTTCCA  
 CTCTTCAGATTTCAGCATTGTTCTTTG**CAGTCTCATTTTTCATCTTCTTCCATG**GTTCCACAGAAG**CTTTG**  
**TTTCTTGGGCAAGCAGAAAAATT**AAATTGTACCTATTTGTATATGTGAGATGTTTAAATAAATTGTGAAAA  
**AAATGAAATAAAGCATGTTTGGTTTT**CCAAAAGAACATAT

Product Size: 141

ID	SuperTag	Donor-nml	CP-nml	IPMT-nml	Tumor-nml
Panc-31866	<b>CATGGAAGAAGATGAAAAATGAGACTG</b>	0,4006	4,9062	20,7209	82,201

**Abbildung 22:** Primer und Sonden für ein Antisense-qPCR-Assay am Beispiel von COL1A2, bei dem der „tagged“ Primer auf dem SuperTag liegt.

### E.1.2 Antisense-cDNA-Synthese mit "Tagged" Primern

Die Assays wurden zunächst mit einem Gesamt-RNA-Mix, der aus jeweils 20 µl der vier verschiedenen Pankreas-RNA-Proben besteht, durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine RNA-Probe der vier verschiedenen Zustände ausgewählt. Auf Grund ihrer unterschiedlichen Konzentration sind die einzelnen Proben zwar nicht zu gleichen Teilen im RNA-Mix vertreten, aber um das äußerst kostbare Probenmaterial zu schonen und da es zunächst nur um den Test des entwickelten Assays ging, ist dieser Faktor unerheblich. Der Gesamt-RNA-Mix wurde mit Baseline-ZERO™ behandelt und mit RNA Clean-Up XS aufgereinigt. Die mit dem Nanophotometer gemessene RNA-Konzentration lag bei über 1.000 ng/µl.

Aus 5 µl des RNA-Mix wurden mit Hilfe der COL1A2-Primer, verschiedene Einzelstrang-cDNAs mit dem SuperScript III™ Doppelstrang cDNA Synthese-Kit von Invitrogen hergestellt, mit dem QIAGEN PCR-Purification Kit aufgereinigt und mittels Absorptionsspektrometrie die Konzentration und Qualität der RNA bestimmt.

**Tabelle 3:** *Ergebnisse und Vergleich der Antisense-cDNA-Ausbeute aus Gesamt-RNA*

Probe	Konzentration [ng/µl]	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
cDNA RTa I	127,0	0,272	0,344	0,192	0,037	1,792	1,265
cDNA RTa II	44,4	0,150	0,120	0,078	0,022	1,538	0,800
cDNA RTb I	127,0	0,356	0,343	0,189	0,026	1,815	0,963
cDNA RTb II	51,4	0,195	0,139	0,095	0,030	1,463	0,713

Wie in Tabelle 3 für einige Beispiele dokumentiert, weist die Antisense-cDNA deutliche Unterschiede in der Qualität auf (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> Werte von 1,46 bis 1,82). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch unspezifische Primerbindung bei

der First-Strand Synthese stattfand. Dies wurde daher mit dem Nested PCR Ansatz (siehe E.1.3 Klonierung und Nested-PCR-Ansatz) untersucht.

Der Ansatz wurde mit amplifizierter RNA (ampRNA) wiederholt. Diese RNA stammt aus dem Ansatz der SuperSAGE-Analysen. Dabei wurde mRNA aus der Gesamt-RNA der Proben in cDNA umgeschrieben und mit Restriktionsenzymen behandelt (siehe B.6 SuperSAGE-Technologie). Die cDNA wurde mittels PCR vervielfältigt und mit einer einfachen Transkriptase wieder in RNA umgeschrieben. Auf diese Weise konnte zusätzliches Probenmaterial für Testzwecke gewonnen werden. Allerdings besteht hier das Problem, dass auf Grund der Behandlung mit Restriktionenzymen der 5'-Bereich der cDNA abgetrennt wurde. Da die SuperTags meist am 3'-Ende der RNA liegen, bleibt meist nur noch ein 50 bis 500 bp langes cDNA-Fragment übrig, dessen 5'-Ende der SuperTag bildet. Trotzdem wurde die ampRNA für die Tests verwendet, insofern die Primer und Sonden, von 5' nach 3' betrachtet, auf bzw. hinter dem SuperTag liegen. Allerdings war dies nicht immer möglich, da einige der SuperTags nur wenige Basen vor dem 3'-Ende lagen.

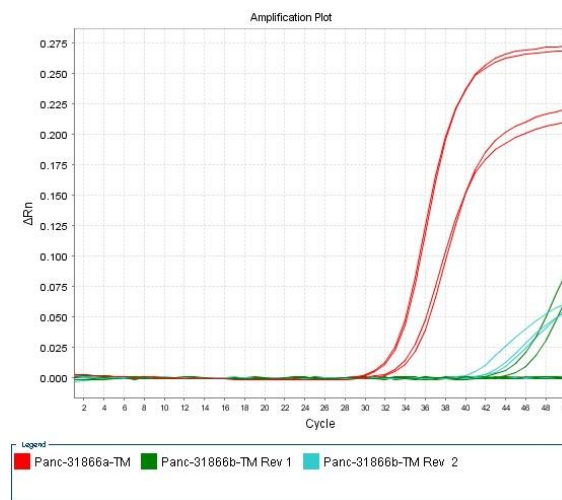
**Tabelle 4:** Ergebnisse und Vergleiche der Antisense-cDNA-Ausbeute aus ampRNA

Probe	Konzentration [ng/μl]	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
cDNA amp RTa I	9,23	0,024	0,023	0,009	-0,002	2,556	0,958
cDNA amp RTb I	8,14	0,065	0,021	0,007	-0,002	3,000	0,323

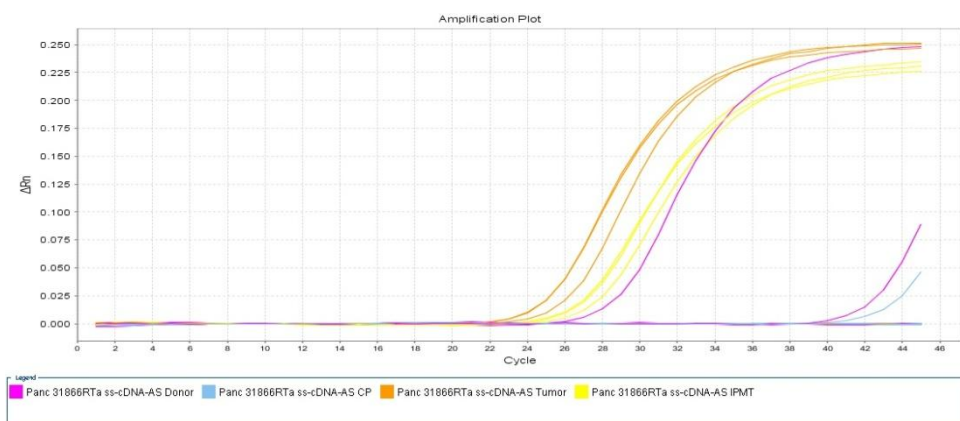
Wie anhand der Ergebnisse zu erkennen ist, stößt das Nanophotometer von IMPLN bei geringen Mengen cDNA oder RNA an seine technischen Grenzen. Die Absorptionswerte schwanken bei geringen Mengen sehr stark und es treten sogar Negativwerte auf. Es ist allerdings deutlich erkennbar, dass auf Grund der zuvor beschriebenen Probleme mit ampRNA nur geringe Mengen in cDNA umgeschrieben wurden. Die Vermutung liegt nahe, dass die Primer nicht, teilweise oder sogar absolut unspezifisch binden konnten.

Es blieb also nur die Möglichkeit weiter mit dem Gesamt-RNA-Mix zu arbeiten und die synthetisierte cDNA durch PCR zu vervielfältigen, damit genügend Probenmaterial für die folgenden Tests vorhanden war.

### E.1.3 Ergebnisse der Antisense qPCR



**Abbildung 23:** Amplifikationsplot nach Test von drei AS-Assays mit Antisense cDNA- Mix (= strangspezifische cDNA-Umschreibung mit dem SuperTag für COL1A2) als Templat.



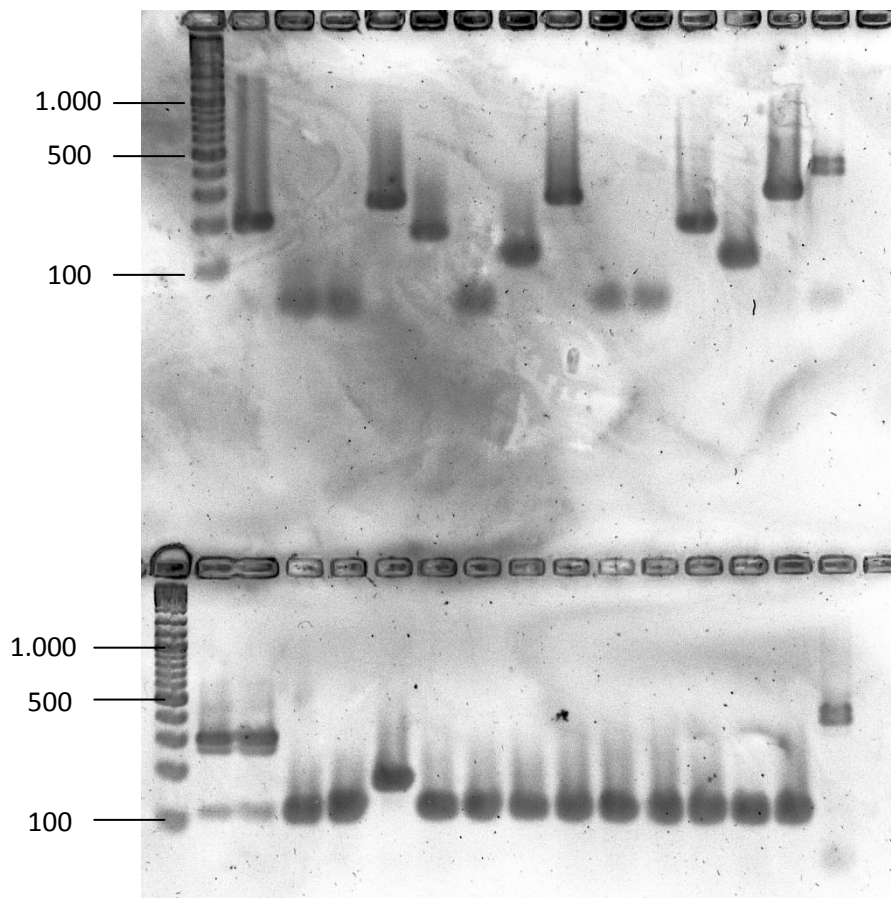
**Abbildung 24:** Amplifikationsplot nach Test vom AS-Assay für COL1A2 mit den vier cDNAs der untersuchten Pankreas-Gewebe (= strangspezifische cDNA-Umschreibung mit dem SuperTag für COL1A2) als Templat.

Wie die Abbildungen 23 und 24 zeigen, funktionierte das AS-Assay-Design mit strangspezifischem cDNA-Mix und cDNAs der einzelnen Gewebe. Leider war dies aber weder reproduzierbar, noch konnte eine Amplifikation mit vier weiteren getesteten Assays erreicht werden.

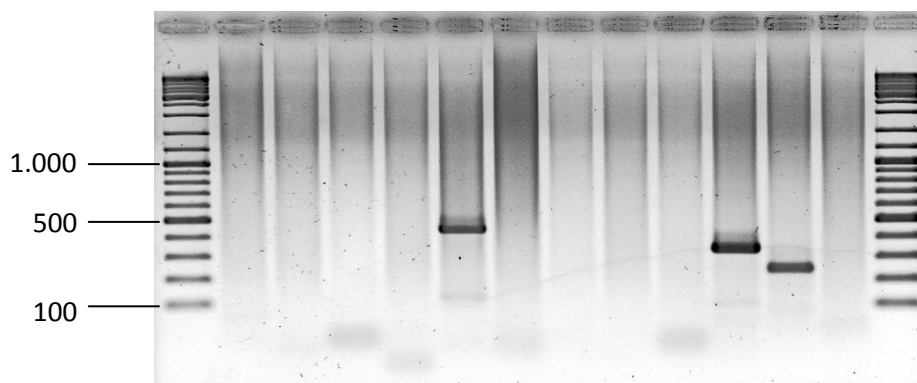
#### **E.1.4 Klonierung und Nested-PCR-Ansatz**

Mit Hilfe des Nested-PCR Ansatzes kann schon vor der Sequenzierung über eine Fragmentanalyse mittels Gelelektrophorese bestimmt werden, ob das gewonnene PCR-Amplikon spezifisch ist. Grundannahme ist hierbei, dass die Antisense-Sequenz der Sense-Sequenz entspricht – nur revers Komplement. Durch Klonierung der Antisense-cDNA in einen Vektor ist eine strangspezifische Überprüfung der Fragmentlänge möglich. Einschränkung ist bei diesem Ansatz nur die Wahl des Antisense-Primers, da das Antisense-Transkript erst ab diesem Abschnitt umgeschrieben wird. In dieser Arbeit wurden nur die AS-SuperTags für die First Strand Synthese verwendet, so dass die Länge des Antisense-Transkriptes nur ab dem Tag bestimmt werden kann.

Da die Tests mit den ersten Primern und Sonden keine reproduzierbaren Ergebnisse ergaben, lag die Vermutung einer unspezifischen Primerbindung nahe. Um das Design der Primer zu verbessern wurde eine Untersuchung zur Länge und Sequenz der Antisense-Transkripte durchgeführt. Dazu wurde die synthetisierte Antisense-cDNA in einen pGemT-Vektor ligiert und in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert (siehe D.5.2 Ligation von DNA in einen Vektor und D.5.3 Transformation von kompetenten Zellen und D.5.4 Colony-PCR).



**Abbildung 25:** Colony-PCR mit M13-Primern. Amplifikate größer als 100 bp dienen als Template für die folgenden PCR-Schritte mit genesteten Primern.



**Abbildung 26:** Nested MangoTaq PCR nach 1. PCR mit M13 Primern und Ligationsansatz als Templat. Mit den jeweils 2 genesteten spezif. Primer wurde für 3 der 12 Ansätze ein Fragment in der erwarteten Größe nachgewiesen.



Nur für drei der hier untersuchten 12 PCR-Ansätze wurde ein spezifisches Amplikon generiert und nachgewiesen. Alle drei entsprachen der erwarteten Fragmentgröße. Nach der Testsequenzierung für das ca. 450 bp Fragment (Bahn fünf, nach Größenmarker) zeigte sich aber, dass es sich um eine unspezifische Umschreibung oder PCR handelte, da keine Bestätigung über Sequenzierung möglich war (überlagernde Sequenzen).

## **E.2 Isolation, Identifikation und Quantifizierung von Sense-RNA**

### **E.2.1 Auswahl von Kandidaten für TaqMan PCR**

Wie bei den Antisense-Transkripten wurden auch hier geeignete Kandidaten auf Grundlage der SuperSAGE-Daten ausgesucht. Ein weiterer entscheidender Faktor bei der Auswahl von Sense-Transkripten war die Funktion der Proteine für die sie kodieren. Betrachtet man die in Tabelle 6 aufgeführten Transkripte, bemerkt man sofort, dass es sich bei den Meisten um Forkhead-Box-Proteine handelt. Diese Proteine sind bei Eukaryoten im Zellkern zu finden, wo sie an bestimmte Sequenzabschnitte der DNA binden und dadurch die Transkription von Genen beeinflussen. So werden von ihnen Funktionen, wie Proliferation, Differenzierung und Zelllebensdauer reguliert. Von der Familie dieser Transkriptionsfaktoren sind bisher ca. 45 verschiedene Proteine bekannt.

Die konstitutiven Transkripte wurden mit Hilfe der Berechnung des Variationskoeffizienten aus dem Quotienten des Mittelwertes und der Standardabweichung der vier RNA-Proben ermittelt. Konstitutiv bedeutet, dass die Genexpression eines Transkriptes in allen vier Zuständen annähernd gleich ist. Je kleiner der Variationskoeffizient, desto geringer die Abweichung zwischen den vier Zuständen. Da der Wert der Genexpression weitestgehend gleich bleibt, eignen sich diese Transkripte hervorragend als Referenz für die relative Quantifizierung (siehe D.4.3 Interpretation der TaqMan-Ergebnisse). Allerdings wurde dabei auch auf die

Höhe der Genexpression geachtet, da niedrig abundante Transkripte bei der qPCR meist nicht korrekt erfasst werden.

Panc-EGFR-fwd TCCCAGTGCCTGAATACATAAA  
Panc-EGFR-rev GTCTGTGCAGAACTCCTGTCTATCACAAT  
Panc-EGFR-Probe CTCTGTGCAGAACTCCTGTCTATCACAAT

>gi|41327737|ref|NM\_005228.3| Homo sapiens epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian) (EGFR), transcript variant 1, mRNA

TCCCAGTGCCTG|AATACATAAA CCAGTCCGTTCCCAAAAGGCCCGCTGG CTCTGTGCAGAACTCCTGTCTAT  
CACAAT CAGCCTCTGAACCCCGCGCCAG CAGAGACCCACACTACCAGGAC CCCCACAGCACTGCAGTGGGC  
AACCCCGAGTATCTCAACACTGTCCAGCCACCTGTGTCAACAGCACATTGACAGCCCTGCCACTGGGCC  
CAGAAAGGCAGCCCAAATTAGCCTGGACAACCCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTCCCAAGGAAGCCAG  
CCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGCAGAAATACCTAAGGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAA  
TTTATTGGAGCATGACCACGGAGGATAGTATGAGCCCTAAAAATCCAGACTCTTTCGATACCCAGGACCAAG  
CCACAGCAGGTCTCCATCCCAACAGC CATGCCCGCATTAGCTCTTAGACCCA CAGACTGGTTTGAACGT  
TTACACCGACTAGCCAGGAAGTACTTCCACCTCGGGCACATTTTGGGAAGTTGCATTCTTTGTCTTCAAAC

Product Size: 123

ID	SuperTag	Donor-nml	CP-nml	IPMT-nml	Tumor-nml
Panc-23465	CATGCCCGCATTAGCTCTTAGACCCA	0,39	1,43	0,76	1,41

**Abbildung 27:** Primer und Sonden für Sense-qPCR-Assay am Beispiel von EGFR

**Tabelle 5:** Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse von 7 konstitutiven Sense-Kandidaten für qPCR (nml = normalisiert; Anzahl SuperTags pro 1 Mio. Transkripte)

ID	Description	Donor-nml	CP-nml	IPMT-nml	Tumor-nml
Panc-YPEL3	Homo sapiens yippee-like 3 (Drosophila), mRNA	40.86	39.25	39.62	38.02
Panc-LYPLA2	Homo sapiens lysophospholipase II, mRNA	42.06	38.48	40.35	40.84
Panc-PDHA1	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	50.48	44.16	46.17	45.98
Panc-IER2	Homo sapiens immediate early response 2, mRNA	78.12	74.37	79.61	85.54
Panc-DCTN6	Homo sapiens dynactin 6, mRNA	78.12	74.37	79.61	85.54
Panc-EIF3B	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B, mRNA	99.75	116.20	111.60	118.16
Panc-SEPN1	Homo sapiens selenoprotein N, 1, mRNA	88.53	105.61	94.88	94.27

**Tabelle 6:** Auszug aus den Ergebnissen der SuperSAGE-Analyse einiger Kandidaten für die qPCR (Sense-Transkripte; nml = normalisiert; Anzahl SuperTags pro 1 Mio. Transkripte)

ID	Description	Donor-nml	CP-nml	IPMT-nml	Tumor-nml
Panc-10409	Homo sapiens forkhead box O1 , mRNA	0.39	0.71	4.55	6.21
Panc-23465	Homo sapiens epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian) , transcript variant 1, mRNA	0.39	1.43	0.76	1.41
Panc-25063	Homo sapiens forkhead box O3B pseudogene, non-coding RNA	0.39	1.19	1.90	0.85
Panc-37611	Homo sapiens forkhead box K2, mRNA	0.39	3.81	1.90	2.82
Panc-54246	Homo sapiens forkhead box C1, mRNA	0.39	1.90	7.21	4.24
Panc-9968	Homo sapiens forkhead box N2, mRNA	0.39	2.85	4.17	2.26
Panc-26029	Homo sapiens forkhead box F2, mRNA	0.50	1.43	1.14	3.39
Panc-27399	Homo sapiens forkhead box P3, transcript variant 2, mRNA	0.50	0.50	6.83	4.52
Panc-27319	Homo sapiens forkhead box L1, mRNA	0.50	0.50	1.14	5.08
Panc-36110	Homo sapiens forkhead box N3, mRNA	0.50	1.90	4.55	4.80
Panc-43969	Homo sapiens forkhead box M1, mRNA	0.50	0.48	1.90	3.67
Panc-55343	Homo sapiens forkhead box Q1, mRNA	0.50	1.43	5.31	8.19
Panc-62253	Homo sapiens forkhead box P1, transcript variant 1, mRNA	0.50	6.90	6.83	4.52
Panc-66538	Homo sapiens forkhead box F1, mRNA	0.50	0.24	1.52	3.39
Panc-69400	Homo sapiens forkhead box D1, mRNA	0.50	0.50	1.90	10.45
Panc-40555	Homo sapiens forkhead box P1, transcript variant 1, mRNA	0.77	1.90	2.66	2.82
Panc-17357	Homo sapiens forkhead box O1, mRNA	1.16	1.43	6.07	14.97
Panc-34742	Homo sapiens epidermal growth factor (beta-urogastrone), mRNA	1.16	1.66	0.76	0.56
Panc-48919	Homo sapiens forkhead box A1, mRNA	1.16	0.95	2.66	11.01

## E.2.2 Ergebnisse der qPCR

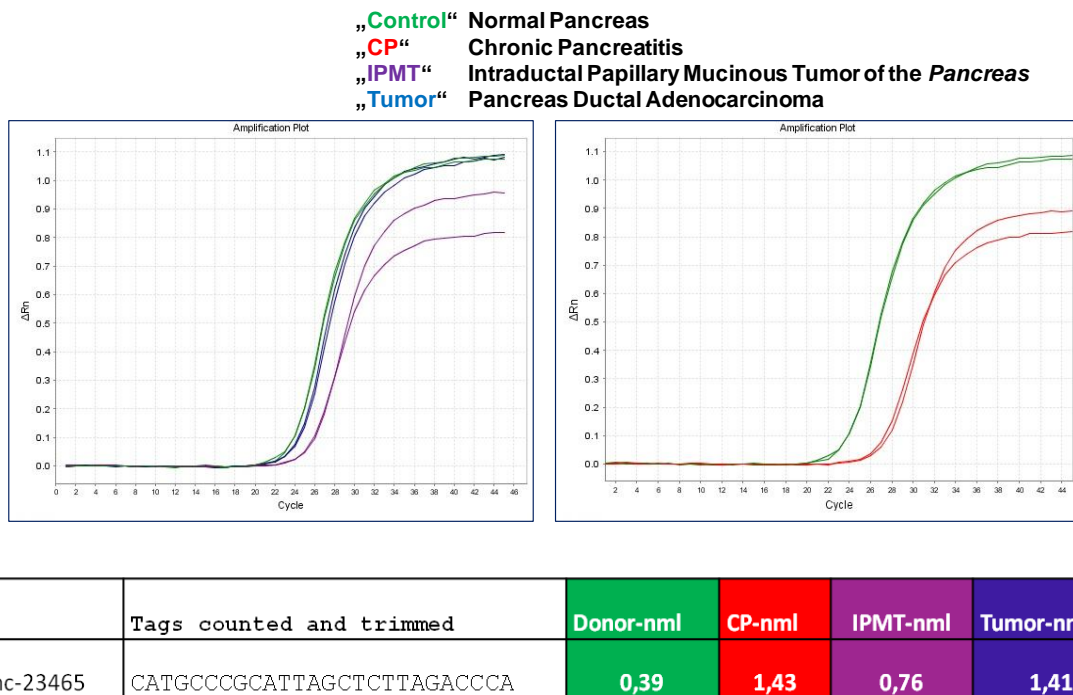


Abbildung 28: Sense-qPCR-Assay für Tag Panc-23465

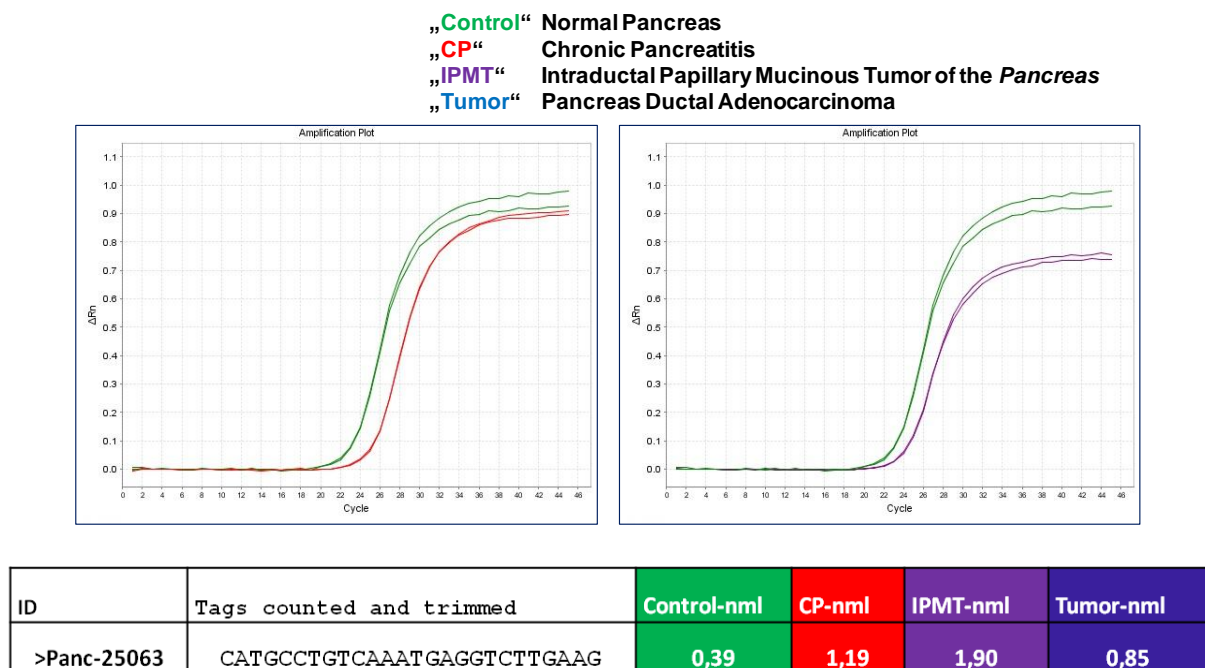


Abbildung 29: Sense-qPCR-Assay für Tag Panc-25063

Die Abbildung zeigt einen Amplifikations-Plot mit linearer Darstellung der  $\Delta R_n$ -Werte und die SuperSAGE-Daten zum Vergleich.  $R_n$  steht für "Reporter normalized", d.h. automatische Korrektur des Reportersignals anhand der passiven Referenz ROX, die dem Mastermix in definierter Konzentration beigemischt ist. Auf diese Weise sollen Pipettierfehler korrigiert werden. Es wurden CT-Werte von 25 für die Kontrolle (= Donor) bis 29 für CP (= chronische Pankreatitis) bei Panc-23465 und CT-Werte von 24 für die Kontrolle bis 26,5 für IPMT bei Panc-25063 bestimmt.

## F. DISKUSSION UND AUSBLICK

Bei den Untersuchungen zu aRNA ergaben sich eine Vielzahl von Problemen und technischen Schwierigkeiten. Eines der größten Probleme war die Auswahl geeigneter Kandidaten in Verbindung mit den Recherchen in der NCBI-Datenbank. So ergab sich aus den un stetigen Ergebnissen der TaqMan-PCR, dass der erste Kandidat (COL1A2) aus verschiedenen Gründen ungeeignet war. So gehört COL1A2 zur großen Familie der Kollagene, deren Transkripte teilweise in einigen Sequenzen Übereinstimmungen aufweisen. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass bei der Quantifizierung auf Grund der geringen Spezifität der Primer und Sonden mindestens ein weiteres Transkript neben COL1A2 amplifiziert wurde. Selbstverständlich ist hier auch der menschliche Faktor nicht auszuschließen. So können durch leichte Pipettier-Fehler Abweichungen in der Zusammensetzung der Reaktionsansätze auftreten, womit die nicht-reproduzierbaren Messwerte der qPCR erklärt wären.

Da Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial verwendet wurde, muss auch bei den oftmals geringen Konzentrationen der synthetisierten cDNA beachtet werden, dass der Anteil von mRNA an Gesamt-RNA nur 1 bis 5 % beträgt. Bei einer Ausgangskonzentration von ca. 1.000 ng Gesamt-RNA pro  $\mu$ l ergibt sich eine Konzentration von lediglich 10 bis 50 ng mRNA pro  $\mu$ l. Dazu kommen drei weitere Faktoren, die die Konzentration weiter senken:

1. Pro Transkript ein Reaktionsansatz, um Primer-Dimerisation zu verhindern
2. Aufreinigung der cDNA nach der Synthese
3. Niedrig abundante Transkripte

Außerdem handelt es sich bei den RNA-Proben um äußerst wertvolles Patienten-Material. Das Verfahren erwies sich somit leider als äußerst schwierig, materialaufwendig und störanfällig.

Die Ansätze zu den Antisense-Transkripten bildeten den Schwerpunkt, dennoch wurden 20 Sense-Assays zur Testung differentieller Expression entwickelt und vier auch schon positiv getestet.

Sieben weitere Assays (Konstitutive) wurden für die relative Quantifizierung entworfen. Allerdings erwies es sich als recht schwierig geeignete konstitutive Transkripte zu finden, da mehrere Bedingungen erfüllt werden mussten, die nur selten zu finden sind. Dazu zählt unter anderem, dass ein Transkript unter allen für die Untersuchung relevanten Bedingungen eine gleichbleibende Expression aufweist. Auch wenn die SuperSAGE-Daten dementsprechende Werte für ein Transkript lieferten, so hat es sich doch oftmals herausgestellt, dass die qPCR diese Daten widerlegt hat. Besonders schwierig wird es, wenn man nicht nur verschiedene Stressfaktoren, sondern zusätzlich noch verschiedene Gewebe betrachtet. Meistens müssen hier unterschiedliche Konstitutive gefunden werden, die für das jeweilige Gewebe geeignet sind. Im weiteren Verlauf des Projektes wurden die sieben Sense-Assays mit Zellkulturmaterial aus einem anderen Krebsprojekt getestet und es zeigte sich, dass die meisten gut funktionieren und auch bei diesem Gewebe drei der sieben Konstitutiven gut für die relative Quantifizierung geeignet sind.

Die Spezifität von Primern und Sonden hat auch immer wieder eine entscheidende Rolle bei den Untersuchungen gespielt. So lassen sich wohlmöglich einige Fehlschläge oder widersprüchliche Ergebnisse auf die Auswahl ungeeigneter Primer und Sonden zurückführen. Trotz aufwendiger, konzentrierter Transkript-Analysen und Vergleichen mit Datenbanken, war auf einigen anderen Gelbildern mehr als eine Bande für ein Primer-Paar zu sehen. Des Weiteren haben Faktoren, wie Temperatur,  $MgCl_2$ -Konzentration, dNTP-Konzentration, Anzahl der Zyklen sowie Menge und Qualität des Templats einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis einer PCR. Daraus ergibt sich eine Vielzahl von Anpassungsmöglichkeiten, um die optimalen Bedingungen einzustellen. Bei Verfahren zur Analyse von Antisense-Transkripten, zu denen es bisher nur einige theoretische Abhandlungen und sehr wenige praktische Nachweise gibt, ist es sehr schwierig alle beeinflussenden Faktoren zu erkennen und zu beachten.

Das Ziel der Nested PCR war die Bestimmung der Länge von Antisense-Transkripten mittels Fragmentanalyse und gegebenenfalls einige vom komplementären Sense-Transkript abweichende Sequenzen. Prinzipiell hat der Ansatz funktioniert und es konnten sogar drei eindeutige Produkte isoliert werden, allerdings lieferte die Sequenzierung einige sich gegenseitig überlagernde Sequenzen, was unter Umständen auf die Spezifität der Primer oder Artefakte zurückzuführen ist. Artefakte können im Verlauf eines langen und komplizierten Verfahrens entstehen, bei dem die RNA bzw. die cDNA stark beansprucht wird, was Degradierungen zur Folge haben kann.



## G. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf der Grundlage von SuperSAGE-Genexpressionsprofilen von gesundem und erkranktem Pankreasgewebe so effizient wie möglich die mRNA Profile von ausgewählten signifikant differentiell exprimierten Sense- und Antisense-Transkripten mittels qPCR zu quantifizieren und damit ihre Eignung als prognostische Tumormarker zu untersuchen. Dabei erwies sich die dazu notwendige Isolation einzelner Transkripte mittels sequenzspezifischer cDNA-Synthese (reverse Transkription) auf Grund der geringen Menge an Ausgangsmaterial und der niedrigen Abundanz der Transkripte als sehr schwierig und konnte nur schwer optimiert werden. Auf der Basis der Genexpressionsprofile wurden unter Verwendung von Primer 3 und der Absicherung durch einen Vergleich mit der EST- und Nukleotiddatenbank von NCBI spezifische qRT-PCR Assays entworfen, welche als SYBR®green und als TaqMan® Assays an vier Pankreas-RNA bzw. Pankreas-cDNA-Proben (normales Gewebe, Chronische Pankreatitis, ein nicht oder selten metastasierender Tumor und ein stark metastasierender Tumor) umgesetzt wurden. Während die für Antisense-Transkripte entwickelten Assays sich als ungeeignet bzw. nicht reproduzierbar erwiesen, konnten 20 Assays für Sense-Transkripte als geeignete Kandidaten für weiterführende Untersuchungen experimentell ermittelt werden. Die spezifischen Primer konnten erfolgreich als SYBR®green Assays eingesetzt werden und ebenso wie drei von sieben ausgewählten und entwickelten konstitutiven Assays für sogenannte Haushaltsgene. Die ermittelten Expressionsdaten der meisten als SYBR®green oder TaqMan getesteten Assays zeigten in der Tendenz ähnliche oder gleiche Expressionsraten wie in den vier Gewebeproben, die mit SuperSAGE analysiert wurden.

## H. ANHANG

### Antisense strand specific quantitative real-time PCR for total RNA

#### I Reverse transcription / first strand cDNA synthesis with Fermentas

The negative strand RNA will be amplified by tagged QRT-PCR. Tagged means, the positive-sense forward primer for cDNA synthesis contains a sequence unrelated to the RNA-sequence at the 5' end (the tag, shown in bold) and mRNA-sequences at the 3' end. It essentially, that the forward primer sequence has to be complementary to the negative/antisense strand RNA only.

e.g.:

Panc-31866

5'-**GGCCGTCATGGTGGCGAATA**AAGATGGCTGCTCTAAAAAGACAAA-3'



The following procedure is designed to convert 100-5000 ng of total Antisense-RNA into first-strand cDNA and add a sequence to the cDNA which is unrelated to the RNA-sequence and can be used as primer for the following QRT-PCR. For negative control of your primer and probe, you will use for the QRT-PCR, you have to perform a second RT for each sample with gene-specific reverse primer (untagged). If everything works right, there should be no signal for this sample when you perform the QRT-PCR.

**Note:** The following procedure is for a single reaction. For multiple reactions, prepare master mix with a 5-10 % overage to enable accurate pipetting.

**Note:** Always work on fresh ice to secure the stability of your samples and other components.

1. Mix and briefly centrifuge each component before use.
2. Treat samples with **Baseline Zero**, incubate at 37°C for at least 30 min and add **Baseline Zero DNase Stop** solution (use Baseline Zero protocol).
3. Before you can start with the reverse transcription, you have to clean up your samples with “**RNeasy Midi Kit**” from **Qiagen** for example.
4. Prepare RNA/primer mixtures in sterile 0.2- or 0.5-ml tubes as follows:

<u>Component</u>	<u>Sample</u>	<u>No RT Control</u>	<u>Control RNA</u>
up to 5 µg total RNA	<i>n</i> µl	<i>n</i> µl	—
10 mM dNTP mix	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl)	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
<b>or</b>			
2 µM GSP	1.0 µl	1.0 µl	—
DEPC-treated water	to 10 µl	to 10 µl	to 10 µl

5. Incubate each mixture at 70° C for 10 min, then place them back on ice for at least 1 min.
6. Centrifuge the tube briefly to collect the contents, and add the following to the tube at room temperature:

<u>Component</u>	<u>Each Rxn</u>	<u>4 Rxns</u>
5X First-Strand-Buffer	4.0 µl	18 µl
0.1 M DTT	2.0 µl	9.0 µl
10 mM dNTP Mix	2.0 µl	9.0 µl
Reverse Aid™ III RT (200 U/µl)	2.0 µl	9.0 µl
<b>Total Reaction Volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>45 µl</b>

7. Mix gently and then centrifuge the tube briefly to collect the contents. Incubate the tube at 46°C for 2 hours.
8. Incubate the tube at 70°C for 10 min to inactivate the reverse transcriptase.
9. Centrifuge the tube briefly to collect the contents and place the tube on ice.
10. Add 1 µl of Exonuclease I (Fermentas) to each sample and incubate at 37°C for 30 min. Inactivate the enzyme at 80°C for 15 min. Place the samples back on ice.
11. Add 1 µl of Ribonuclease H (Fermentas) to each sample and incubate at 37°C for 30 min.
12. Clean up your samples with “QIAquick PCR Purification Kit” and make a measurement of ss-cDNA concentration with Implen Nanophotometer.

## ***II Second strand cDNA synthesis***

1. Prepare PCR reaction (50 µl) on ice in the following order for each sample:
  - 2 µl First Strand Synthesis Reaction after RNase H digest
  - 40 µl DEPC-treated water (to a final volume of 50 µl)
  - 5 µl PCR Buffer (10x) with  $\text{MgCl}_2$  (1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  in the final reaction) - Fermentas
  - 1 µl dNTPs (10 mM each dNTP)
  - 2 µl Random Hexa-Decamers (10 µM Oligonucleotides)
  - 0.5 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl) - Fermentas
2. mix, centrifuge down and chill on ice.
3. Start the thermocycler program and wait until block temp reach ca. 90 °C, than put the samples from ice in the thermocycler (cold start method).

### **PCR program:**

initial denaturation:

3 min at 96 °C

30-35 cycles:

30 sec at 96 °C denaturation

30 sec at ... °C annealing (calc temp for every gene specific primer)

1 min at 72 °C elongation

final elongation:

5 min at 72 °C

### **III     *Antisense QRT-PCR with TaqMan<sup>TM</sup> (TwoStep)***

With your cDNA you can perform a qRT-PCR to quantify your antisense-products. The TaqMan probe contains a reporter dye at the 5' end of the probe and a quencher dye at the 3' end of the probe. During the reaction, cleavage of the probe separates the reporter dye and the quencher dye, which results in increased fluorescence of the reporter. Accumulation of PCR products is detected directly by monitoring the increase in fluorescence signal of the reporter dye.

#### **1 - DNA PLATES PREPARATION :**

Dispense **10 ng** cDNA per well, in Taqman PCR plate.

Positive controls of known cDNA (if available) as well as NTCs (no template controls) are added on plates along with the samples.

#### **2 - PROBES and PRIMERS PREPARATION :**

Primers and Probes mother solutions must be kept frozen at -20°C for long term storage. Dilutions of Probes and Primer can be stored at 4°C for up to a year.

##### **2.1 - Probes :**

If probes come dried, resuspend at 100 µM, then dilute part of it at 0.4 µM (working solution).

**NB : Keep all probes in the dark.**

##### **2.2 - Primers :**

Use the tag-sequence from the tagged primer, that was applied for reverse transcription, as forward primer and a RNA-specific reverse primer. Dilute primers at 10 µM (working solution).

### qRT-PCR Mastermix (TwoStep)

Reagents	1x	5x	9x	12x	17x
TaqMan 2x PCR Mastermix	6	30	54	72	102
Sonde (0,4 µM)	0,5	2,5	4,5	6	8,5
Primer (10µM) each	0,25	1,25	2,25	3	4,25
ddH <sub>2</sub> O (DEPC)	3	15	27	36	51
total Volume	10	50	90	120	170

### Attention with these transcripts (similarity to tag-sequence):

NM\_001009824.1

Homo sapiens growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR), transcript variant 2, mRNA

max. score: 28.2  
total score: 28.2  
query coverage: 66 %  
e-value: 74  
max. ident: 100 %

NM\_000823.2

Homo sapiens growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR), transcript variant 1, mRNA

max. score: 28.2  
total score: 28.2  
query coverage: 66 %  
e-value: 74  
max. ident: 100 %

NM\_198216.1

Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1 (SNRPB), transcript variant 1, mRNA

max. score:	28.2
total score:	28.2
query coverage:	66 %
e-value:	74
max. ident:	100 %

NM\_003091.3

Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1 (SNRPB), transcript variant 2, mRNA

max. score:	28.2
total score:	28.2
query coverage:	66 %
e-value:	74
max. ident:	100 %

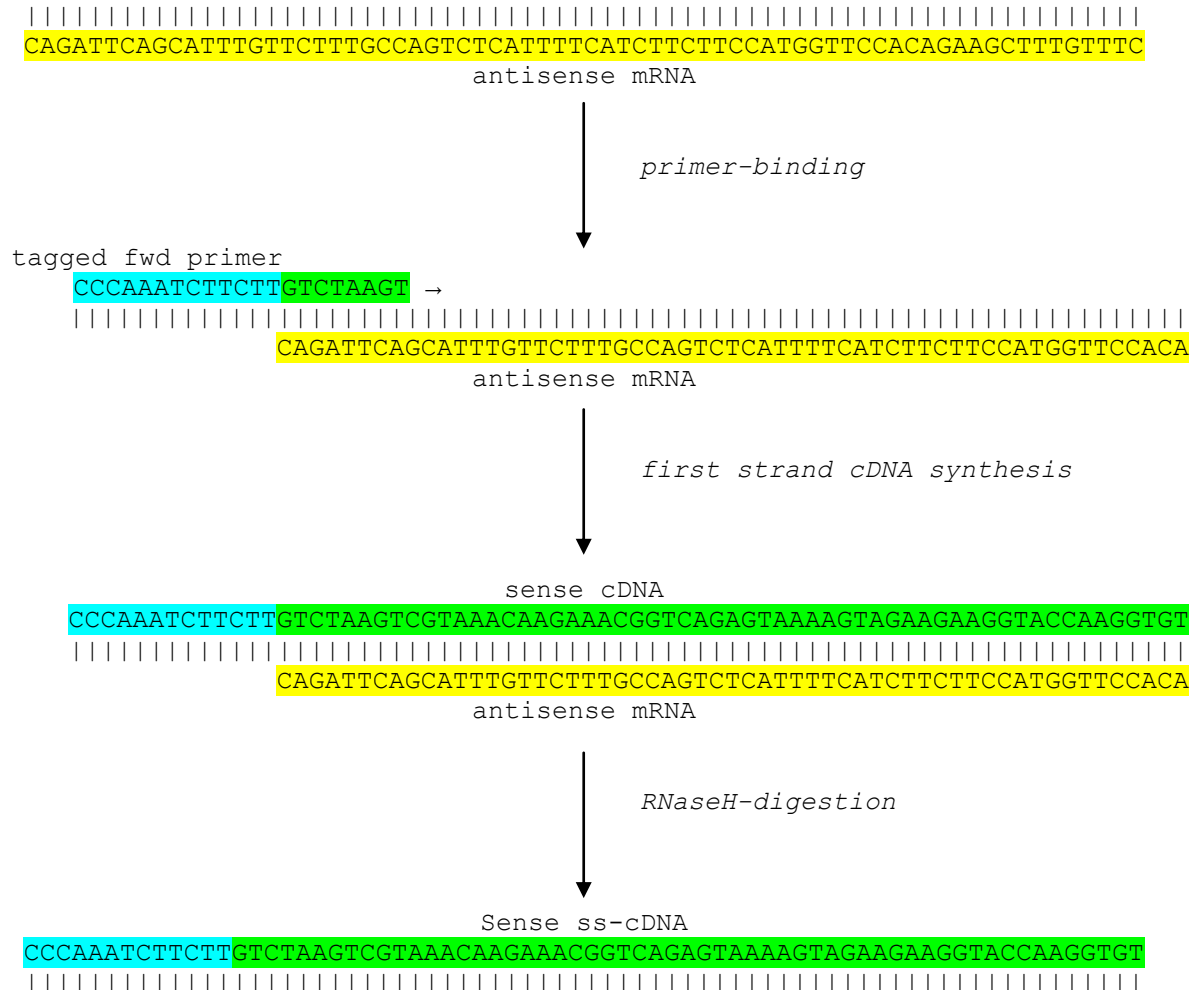
NM\_001005566.1

Homo sapiens olfactory receptor, family 5, subfamily B, member 2 (OR5B2), mRNA

max. score:	28.2
total score:	28.2
query coverage:	66 %
e-value:	74
max. ident:	100 %

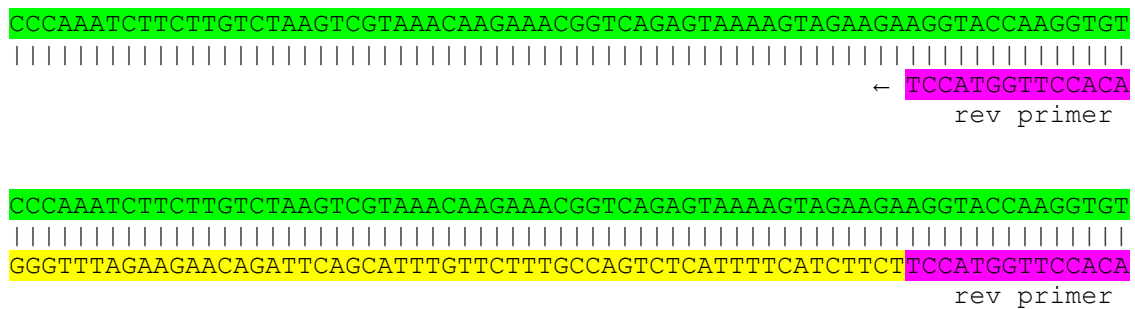
## Antisense spezifische qRT-PCR

### first strand cDNA-Synthese



### TaqMan-PCR TwoStep-Assay

1st cycle







2nd cycle

```

CCCAAATCTTCTTGTCTAAGTCGTAAACAAGAAACGGTCAGAGTAAAAGTAGAAGAAGGTACCAAGGTGT
|||||
GGGTTTAGAAGAACAGATTCAGCATTGTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTTCTTCCATGGTTCCACA
                                     rev primer
  
```

tag as fwd primer

probe

```

CCCAAATCTTCTTGTCTAAGTCGTAAACAAGAAACGGTCAGAGTAAAAGTAGAAGAAGGTACCAAGGTGT
|||||
GGGTTTAGAAGAACAGATTCAGCATTGTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTTCTTCCATGGTTCCACA
  
```



3rd cycle

```

CCCAAATCTTCTTGTCTAAGTCGTAAACAAGAAACGGTCAGAGTAAAAGTAGAAGAAGGTACCAAGGTGT
|||||
GGGTTTAGAAGAACAGATTCAGCATTGTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTTCTTCCATGGTTCCACA
                                     rev primer
  
```

```

CCCAAATCTTCTTGTCTAAGTCGTAAACAAGAAACGGTCAGAGTAAAAGTAGAAGAAGGTACCAAGGTGT
|||||
GGGTTTAGAAGAACAGATTCAGCATTGTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTTCTTCCATGGTTCCACA
                                     rev primer
  
```

tag as fwd primer

probe

```

CCCAAATCTTCTTGTCTAAGTCGTAAACAAGAAACGGTCAGAGTAAAAGTAGAAGAAGGTACCAAGGTGT
|||||
GGGTTTAGAAGAACAGATTCAGCATTGTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTTCTTCCATGGTTCCACA
  
```

tag as fwd primer

probe

```

CCCAAATCTTCTTGTCTAAGTCGTAAACAAGAAACGGTCAGAGTAAAAGTAGAAGAAGGTACCAAGGTGT
|||||
GGGTTTAGAAGAACAGATTCAGCATTGTCTTTGCCAGTCTCATTTTCATCTTCTTCCATGGTTCCACA
  
```



ASO

## I. QUELLENVERZEICHNIS

Agilent Technologies. (1. Februar 2008). Agilent 2100 Bioanalyzer. *Broschüre*.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1990). *Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.

Argani, P., Rosty, C., Wilentz, R. E., Reiter, R. E., Murugesan, S. R., Leach, S. D., et al. (1. Juni 2001). Discovery of New Markers of Cancer through Serial Analyse of Gene Expression: Prostate Stem Cell Antigen is Overexpressed in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research* (61) , S. 4320-4324.

Case, C. C. & Dhundale, A. R. (1991). Meeting Report: Gene Regulation by Antisense RNA and DNA. *Antisense Research and Development* (1) , S. 207-217.

Clontech. (25. Februar 2009). Sprint RT Complete. *Protokoll* .

Deutsche Krebshilfe e.V. (Juni 2006). *Deutsche Krebshilfe*. Abgerufen am 16. Februar 2010 von [http://www.krebshilfe.de/fileadmin/Inhalte/Downloads/PDFs/Blaue\\_Ratgeber/014\\_bauchspeicheldruese.pdf](http://www.krebshilfe.de/fileadmin/Inhalte/Downloads/PDFs/Blaue_Ratgeber/014_bauchspeicheldruese.pdf)

Duesberg, P. (1. Oktober 2007). Das Chaos in den Chromosomen. *Spektrum der Wissenschaft* , S. 55f.

Gaedeke, N. (2007). Biowissenschaftlich recherchieren. *Sequenzähnlichkeitssuche mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) in den Sequenzdatenbanken des NCBI* (S. 79-112). Basel: Birkhäuser Basel.

Greaves, M. (2002). *Krebs - der blinde Passagier der Evolution, 1. Auflage*. Heidelberg: Springer Verlag.

Gubler, U. & Hoffmann, B. J. (November 1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* (25) , S. 263-269.

- Hahn, S. (6. November 2007). Mit neuen molekularen Techniken Pankreaskrebs frühzeitig erkennen: Nur ein paar Zellen. *RUBIN*, S. 45-47.
- Hammer, J., Hammer, H. F. & Schöffel, R. (1. April 2006). Chronische Pankreatitis und Pankreasinsuffizienz – Empfehlung zur Diagnosestellung und Therapie in der Praxis. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen - Fachzeitschrift für Erkrankungen des Verdauungstraktes* (4), S. 7-11.
- He, L. & Hannon, G. J. (Juli 2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Review Genetics* (5), S. 522-531.
- Holland, P. H., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. (15. August 1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' ---- 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* (88), S. 7276-7280.
- Invitrogen. (3. Oktober 2003). SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. *Handbuch*.
- Kahl, G. (2009). *The Dictionary of Gene Technology*, 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Knippers, R. (1995). *Molekulare Genetik*, 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Lanford, R. E., Sureau, C., White, R., Jacob, J. R. & Fuerst, T. R. (1. August 1994). Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with Hepatitis C Virus Using Strand-Specific RT/PCR. *Virology* (202), S. 606-614.
- Matsumura, H., Reich, S., Ito, A., Saito, H., Kamoun, S., Winter, P., et al. (23. Dezember 2003). Gene expression analysis of plant hostpathogen interactions by SuperSAGE. *PNAS* (100), S. 15718-15723.
- Matsumura, H., Reuter, M., Krüger, D. H., Winter, P., Kahl, G. & Terauchi, R. (1. Oktober 2008). SuperSAGE: A Modern Platform for Genome-Wide Quantitative Transcript Profiling. *Current Pharmaceutical Biotechnology* (9), S. 368-374.

- Mülhardt, C. (2006). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 5. Auflage (S. 54). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nakamura, T., Fidler, I. J. & Coombes, K. R. (1. Januar 2007). Gene Expression Profile of Metastatic Human Pancreatic Cancer Cells Depends on the Organ Environment. *Cancer Research* (67) , S. 139-148.
- Okayama, H. & Berg, P. (Februar 1982). High-Efficiency Cloning of Full-Length cDNA. *Molecular and Cellular Biology* (2) , S. 161-170.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* (29) , e45.
- Pradel, F. K., Perret, M., Deiman, B., Sodoyer, M., Lotteau, V., Baccalà, G. P., et al. (1. März 2004). Strand specific quantitative real-time PCR to study replication of hepatitis C virus genome. *Journal of Virological Methods* (116) , S. 103-106.
- Renneberg, R. (2007). *Biotechnologie für Einsteiger*, 2. Auflage. München: Elsevier GmbH.
- Rosien, U., Layer, P., Keller, J. & Kahl, M. (2008). Chronische Pankreatitis. In U. Rosien & P. Layer, *Praktische Gastroenterologie*, 3. Auflage (S. 581-587). München: Elsevier GmbH.
- Schild, T. A. (1998). *Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*. Weiterstadt: Applied Biosystems GmbH.
- Schmid, R. D. (2006). *Taschenatlas der Biotechnologie*, 2. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Varmus, H. (1. November 1987). Reverse Transkription. *Spektrum der Wissenschaft*, S. 112-119.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (20. Oktober 1995). Serial Analysis of Gene Expression. *Science* (270) , S. 484-487.
- Wagener, C. (2001). *Molekulare Onkologie: Perspektiven für die Krebsdiagnostik und -therapie*. Roche.

- Watson, J. D., & Crick, F. C. (25. April 1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* , S. 737-738.
- Weaver, R. F. (2005). In *Molecular Biology*, 3. Auflage (S. 432-488). New York: McGraw-Hill Publ.Comp.
- Weaver, R. F. (2005). In *Molecular Biology* (S. 432-488). New York.
- Wienholds, E., & Plasterk, R. H. (31. Oktober 2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters* (579) , S. 5911-5922.

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Diplomordnung der Fakultät bekannt ist, ich die Diplomarbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts haben mich Herr Dr. Ralf Horres, Leiter der Markerabteilung der GenXPro GmbH, sowie Frau Prof. Dr. Petra Radehaus unterstützt. Die Prüfungsarbeit habe ich weder für eine staatliche noch für andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht. Ich erkläre hiermit, die Arbeit bzw. eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei keiner anderen Hochschule eingereicht zu haben.

---

Bearbeitungsort, Datum

---

Unterschrift